Autoimmunität nach Infektion mit dem Laktatdehydrogenase-Virus: Analyse der Immunantwort und Gewinnung monokonaler Antikörper

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Armin Großmann
aus Leonberg

1987

Univ.
Leipzig
Kirst.

Autoimmunität nach Infektion mit dem Laktatdehydrogenase-Virus: Analyse der Immunantwort und Gewinnung monokonaler Antikörper

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Armin Großmann
aus Leonberg

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Sander
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. R.G. Hess

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. E. Sander und Frau Dr. E. Weiland am Institut für Mikrobiologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen durchgeführt.

Frau Dr. E. Weiland danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, die gute Beratung, großzügige Unterstützung und fachliche Diskussion während der Durchführung der Arbeit.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. F. Weiland und Frau A. Straubinger.

Bei Herrn Dr. H.-J. Thiel möchte ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung von Radioimmunpräzipitationen und für die Überlassung von HF-Zellen bedanken.

Herrn Dr. P.-J. Enzmann und Herrn B. Bruchhof danke ich für die Übelassung von zwei Fischzellinien und die Hilfe bei der Durchführung von Immunoblotting-Experimenten.

Frau A. Lüske, Herrn P. Schröter und Herrn R. Straub gilt mein Dank für die Hilfe bei der Anfertigung von Zeichnungen und Fotomontagen.

Frau S. Schucht und Frau J. Knapp danke ich für die Bereitstellung von Zellkulturen und technische Hilfe.

Bei den Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und das Interesse bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material	5
2.1.	Virus, Versuchstiere und Zellinien	5
2.2.	Geräte und Verbrauchsmaterial	7
2.3.	Puffer und Lösungen	8
2.4.	Zellkulturmedien und Zusätze	14
2.5.	Seren, Antiseren und Antikörper	15
2.6.	Chemikalien	16
3.	Methoden	18
3.1.	Infektion von Mäusen mit LDV_{AGIA}	18
3.2.	Serumgewinnung	18
3.3.	Nachweis der Infektion mit LDV_{AGIA}	18
3.3.1.	Bioassay	18
3.3.2.	Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum	19
3.3.3.	Virusgewinnung	19
3.4.	Zellkulturen auf Objektträgern	19
3.5.	Infektion von Makrophagen *in vitro* mit LDV_{AGIA}	20
3.6.	Infektion von Makrophagen *in vivo* mit LDV_{AGIA}	21
3.7.	Indirekte Immunfluoreszenz	22
3.8.	Subklassenbestimmungen	24
3.9.	Bestimmung der IgG- und IgM-Konzentration im Serum durch radiale Immundiffusion	25
3.10.	Titerbestimmung von Autoantikörpern im Serum	26
3.11.	Produktion monoklonaler Autoantikörper	27
3.12.	Charakterisierung der monoklonalen Autoantikörper	31
3.12.1.	Spezifität der Autoantikörper	31
3.12.2.	Reaktionsspektrum monoklonaler Autoantikörper auf verschiedenen Kulturzellen	33
3.13.	Charakterisierung der Golgi-Antigene	35
3.13.1.	Radioimmunpräzipitation	35
3.13.2.	Immunoblotting	37
3.13.3.	Immunelektronenmikroskopie	39
3.14.	Produktion monoklonaler Antikörper gegen Virusantigene	43
3.15.	Charakterisierung der Virusantigene	43

3.15.1. Radioimmunpräzipitation 43
3.15.2. Immunoblotting 44

4. Ergebnisse 47
4.1. Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA} 47
4.2. Infektion von Makrophagen mit LDV_{AGIA} *in vivo* 50
4.3. Infektion von Makrophagen mit LDV_{AGIA} *in vitro* 52
4.4. Bestimmung der IgM- und IgG-Konzentration im Serum vor und nach der Infektion 54
4.5. Titerbestimmung von Autoantikörpern gegen zelluläre Antigene im Serum infizierter Mäuse 56
4.6. Subklassenbestimmung der Autoantikörper im Serum infizierter Mäuse 63
4.7. Produktion monoklonaler Autoantikörper 68
4.8. Charakterisierung der monoklonalen Autoantikörper 76
4.8.1. Spezifität der Antikörper gegen zelluläre Antigene 76
4.8.2. Reaktionsspektrum der monoklonalen Autoantikörper auf verschiedenen Kulturzellen 82
4.9. Charakterisierung der Golgi-Antigene 85
4.9.1. Radioimmunpräzipitation und Gelelektrophorese 85
4.9.2. Immunoblotting 92
4.9.3. Immunelektronenmikroskopie 94
4.10. Produktion monoklonaler Virusantikörper 97
4.11. Charakterisierung der Virusantigene 102
4.11.1. Radioimmunpräzipitation 102
4.11.2. Immunoblotting 105

5. Diskussion 110

6. Zusammenfassung 125

7. Literaturverzeichnis 127

8. Abkürzungen 139

1. Einleitung

Neben klassischen Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes-Formen, Myasthenia gravis oder rheumatoider Arthritis, gibt es eine Reihe weiterer Krankheiten mit vermuteter oder gesicherter Immunpathogenese bei Mensch und Tier. Dabei bezeichnet Autoimmunität einen durch den Verlust der Autoimmuntoleranz, d.h. die Immuntoleranz gegen körpereigene Strukturen, gekennzeichneten Immunstatus. Eine Autosensibilisierung führt dann zu einer humoralen oder zellvermittelten Immunreaktion gegen körpereigene Bestandteile, die klinisch symptomlos verlaufen oder zu einer Autoimmunkrankheit führen kann. Sind an einem Autoimmunprozeß B-Lymphozyten beteiligt, lassen sich im Serum und oft in anderen Körperflüssigkeiten Autoantikörper nachweisen, die je nach Art der Erkrankung organspezifisch oder systemisch reagieren können. Wird die Spezifität dieser Antikörper näher untersucht, so lassen sich häufig zelluläre Strukturen als Autoantigene identifizieren: unter anderem DNA (Stott, 1985; Schwartz, 1986), Strukturen des Zytoskeletts (Dellagi *et al.*, 1982; Boehme *et al.*, 1986), Mitochondrien (Frazer *et al.*, 1985), Ribosomen (Francoeur *et al.*, 1985) oder Antigene des Golgi-Apparates (Rodriguez *et al.*, 1982; Fritzler *et al.*, 1984).

Über die Ätiologie von Autoimmunerkrankungen beim Menschen ist meist sehr wenig bekannt. Häufig diskutiert wird eine Beteiligung von Viren bei der Auslösung der Autoimmunreaktion. Im Tierversuch konnte vereinzelt der Nachweis solcher virusinduzierter Autoantikörper erbracht werden. So führt Infektion von Mäusen mit Reovirus zur Induktion eines Autoimmunstatus der Tiere (Onodera *et al.*, 1981; Haspel *et al.*, 1983a,b) mit der Produktion von Autoantikörpern, die gegen zytoplasmatische und Oberflächenantigene verschiedener Zellen gerichtet sind (Onodera *et al.*, 1982). Wolfgram *et al.* (1985) und Neu *et al.* (1987) finden nach Infektion von Mäusen mit Coxsackie-Virus B_3 Herz-spezifische Antikörper, die gegen Myosin gerichtet sind. Anti-DNA-Autoantikörper wurden beobachtet bei Nerzen, die mit Aleutian Disease Virus infiziert worden waren (Hahn & Kenyon, 1980) und von Antikörpern gegen Intermediärfilamente wurde nach Infektion von

Mäusen mit Vaccinia-Virus berichtet (Dales *et al.*, 1983).

Weiland *et al.* (1984) konnten zeigen, daß in Mäusen mit bestimmten Tumoren die Bildung von anti-Golgi-Antikörpern zu beobachten war. Im Verlauf der Studien konnte gezeigt werden, daß nicht der Tumor selbst für die Induktion der Golgi-Autoantikörper verantwortlich war, sonder ein filtrierbarer Erreger, der bei der kontinuierlichen *in vivo*-Passage des Tumors weitergegeben wurde. Dieser Erreger, vorübergehend als anti-Golgi inducing agent ("AGIA") bezeichnet, ließ sich unabhängig von den Tumorzellen auf andere Mäuse durch Inokulation von Serum Golgi-Autoantikörper-produzierender Tiere übertragen (Weiland & Weiland, 1985). "AGIA" wurde in weiteren Studien charakterisiert und als ein Stamm des Laktatdehydrogenase-Virus (LDV) identifiziert (Weiland *et al.*, 1987), der die Eigenschaft besaß, die Bildung von zwei Autoantikörpergruppen so regelmäßig zu induzieren, daß darauf ein Bioassay zum Nachweis des Erregers aufgebaut werden konnte: Antikörper gegen Antigene des Golgiapparates und Antikörper gegen ein Oberflächenantigen bestimmter Tumorzellen.

LDV wurde erstmals von Riley *et al.* (1960) beschrieben. Infektion mit dem Virus war charakterisiert durch einen starken Anstieg der Laktatdehydrogenase (LDH) - Aktivität im Serum infizierter Tiere, einer Eigenschaft, die, bis zur Beschreibung der Autoantikörper-induzierenden Fähigkeit des Virus (Weiland *et al.*, 1987), als einziger zuverlässiger Nachweis einer LDV-Infektion angesehen wurde (Rowson & Mahy, 1985).

LDV erscheint im elektronenmikroskopischen Bild als ein umhülltes sphärisches Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50nm. Das Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 35nm besteht aus einem Virusprotein (VP1) mit einem Molekulargewicht von 15kD; die Hülle besteht aus zwei Viruproteinen: VP2 mit einem Molekulargewicht von 18kD und einem heterogenen Glykoprotein (VP3) mit etwa 32kD. Die Virusnukleinsäure besteht aus einer einsträngigen RNA mit einem Molekulargewicht von $5x10^6$. Aufgrund der physikalischen und chemischen Eigenschaften wird LDV in die Familie der nonarbo-Togaviren eingeordnet.

LDV führt in infizierten Tieren zu einer persistierenden Infektion. In der akuten Phase der Infektion (24-96h p.i.) lassen sich extrem hohe Virustiter von bis zu 10^{11} ID_{50}/ml im Serum

beobachten, die kurz danach rasch absinken auf Werte um etwa 10^5 ID_{50}/ml während der chronischen Phase der Infektion.

Das Wirtsspektrum des Virus beschränkt sich auf alle Stämme von wild vorkommenden und Labormäusen. Die einzigen für LDV *in vitro* permissiven Zellen sind eine Subpopulation von murinen Makrophagen (Brinton-Darnell *et al.*, 1975), die etwa 10-15% der Gesamtzellpopulation ausmacht. Nach Inada & Mims (1984; 1985) ist diese Subpopulation durch die Präsentation des Ia-Antigens auf der Zelloberfläche charakterisiert.

Infektion von Mäusen mit LDV führt neben der Erhöhung der LDH-Aktivität auch zu einem starken Anstieg der Immunglobulinkonzentrationen im Serum (Notkins *et al.*,1966), der vor allem die IgG_{2a}- und in geringerem Maß auch die IgG_{2b}-Subklasse betrifft (Michaelidis & Simms, 1977; Coutelier & van Snick, 1985). Allerdings ist nur ein kleiner Teil der produzierten Antikörper LDV-spezifisch wie Fusionsexperimente mit Milzzellen infizierter Tiere ergaben (Coutelier & van Snick, 1985; Harty *et al.*, 1987). Als Ursache für die gestiegenen Immunglobulinkonzentrationen wurde daher eine polyklonale B-Zell-Stimulierung durch das Virus angenommen.

In der Regel bewirkt eine persistierende Infektion von Mäusen mit LDV keine klinisch erkennbaren Beeinträchtigungen, so daß es möglich ist, die Immunantwort der Tiere auch über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Nur in zwei Mäusestämmen (C58 und AKR) führt eine Infektion von alten und/oder immunsupprimierten Mäusen zur Ausbildung einer Polioencephalomyelitis mit der Zerstörung von Nervenzellen (Martinez *et al.*, 1980; Nawrocki *et al.*, 1980).

Die lange unentdeckte Tatsache, daß LDV-Infektion die Bildung von Autoantikörpern induziert (Weiland *et al.*, 1987), macht es nun möglich, modellartige Studien über den Mechanismus der Entwicklung von Autoimmunvorgängen durchzuführen. Das LDV-Maus Modell ist für diese Untersuchungen besonders bedeutsam, weil die Entstehung von Autoimmunität immer mit der Virusinfektion korreliert ist und weil sie sich im adulten immunkompetenten Organismus entwickelt. Im Gegensatz zum LDV-Modell lassen sich bei den bereits erwähnten murinen Virusinfektionen mit Reovirus (Onodera *et al.*, 1981; Haspel *et al.*, 1983a,b) und Coxsackie-Virus B_3 (Wolfgram *et al.*, 1985), bei denen ebenfalls Autoimmunität beobachtet wird, diese

Vorgänge nur durch Infektion immuninkompetenter Saugmäuse erzeugen.

Um modellartige Studien über die Regulation virusinduzierter Autoimmunität an LDV-infizierten STU-Mäusen vornehmen zu können, sollten im Rahmen der vorliegenden Studie folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

-Untersuchung über Auftreten und Dauer der Nachweisbarkeit virusinduzierter Autoantikörper gegen Golgi-Antigen und weitere zelluläre Antigene

-Bestimmung ihrer Subklassenzugehörigkeit im Verlauf der Virusinfektion

-Durchführung von Fusionsexperimenten mit Myelomzellen und Milzzellen LDV_{AGIA}-infizierter Mäuse zur Gewinnung monoklonaler Autoantikörper gegen zelluläre Strukturen und zur Gewinnung monoklonaler Virusantikörper

-Anwendung der monoklonalen Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz, in der Radioimmunpräzipitation und Polyacrylamid-Gelelektrophorese, im Immunoblottingverfahren und in der Immunelektronenmikroskopie zur Charakterisierung der Autoantigene bzw. der Virusantigene als Basis für Untersuchungen auf Kreuzantigenität zwischen Virus- und Autoantigenen

Die zuletzt genannten Untersuchungen dienen der Prüfung der Hypothese, ob Antigenverwandschaft zwischen Erreger und Autoantigen für die Entstehung der LDV_{AGIA}-induzierten Autoimmunität verantwortlich sein kann.

Die Etablierung monoklonaler Golgi-Antikörper war darüberhinaus von allgemeinem Interesse, da konventionelle Immunisierungen bislang nicht zur Gewinnung solcher Golgi-Antikörper führten, die mit Kulturzellen von mehreren Vertebratenklassen oder mit murinen Golgi-Antigenen reagieren.

2. Material

2.1. Virus, Versuchstiere und Zellinien

Virus:

LDV_{AGIA}, Isolat des Laktatdehydrogenase-Virus von einem Tumorderivat PV-T-112, das durch einen Progressorstamm des murinen Moloney-Sarkom Virus induziert worden war (Weiland & Weiland, 1985). Das Virus wurde durch *in vivo*-Passage in STU-Mäusen vermehrt und durch mehrere Endpunktverdünnungen *in vivo* kloniert.

Mäusestämme:

-STU (Schäfer, 1979): Mäuse-Inzuchtstamm aus hauseigener Zucht, verwendet für Infektionen und die Gewinnung von Peritonealmakrophagen

-Balb/c: aus hauseigener Zucht, verwendet für die Gewinnung von Peritonealmakrophagen

-Mäuse der F_1-Generation aus der Kreuzung von STU-Männchen und Balb/c-Weibchen, verwendet für die Produktion von Ascites-Flüssigkeit.

Zellinien:

Für die Immunfluoreszenz:

Maus: -Schä-T-D: Zellinie aus einem spontan aufgetretenen Tumor einer STU-Maus (Weiland *et al.*, 1984)

-MCA: Zellinie aus einem durch 3-Methyl-Cholantren induzierten Tumor bei STU-Mäusen (Weiland & Weiland, 1985)

-MEF: Maus-Embryonal-Fibroblasten von STU-Mäusen

Ratte: -208F: Thioguanin resistente Variante von Rat-1-Zellen (Quade, 1979; Curran & Teich, 1982)

-RS1: Durch murines FBJ-Sarcomvirus transformierte 208F-Zellen (Curran & Teich, 1982)

-NRK: Rattennierenzellen (CRL 1570)

-XC: Rous Sarkomvirus-transformierte White-Weston Rattenzellen (CCL 165)

Nerz: -ML: Nerzlungenzellen (CCL 64)

Affe: -Vero: Affennierenzellen (CCL 81)

Mensch: -HF: Human foreskin, nicht etabliert, Zellinie erhalten von Herrn Dr. Thiel, BFAV-Tübingen

Rind: -MDBK: Rindernierenzellen (CCL 22)

Huhn: -CEF: Hühner-Embryonal-Fibroblasten (Laemmli, 1970)

Fisch: -RTG: Forellengonadenzellen (CCL 55)

-CHSE: Lachs-Embryonal-Zellen (CRL 1681)

Myelomzellinie für Fusionen:

SP2/0-Ag14 (Shulman *et al.*, 1978): Myelomzellinie aus Balb/c-Mäusen, die selbst keine Immunglobulinketten produziert, HGPRT⁻ (besitzt keine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Aktivität und stirbt in einem Medium, das Aminopterin enthält).

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterial

-Blotting-Apparatur, BioRad, München

-CO_2-Begasungsbrutschrank, Bergmann, Berlin

-Elektrophorese-Apparatur, Hoefer, San Francisco, USA

-Geltrockner, Hoefer

-Immobilon-Membran, Millipore, Neu-Isenburg

-Immundiffusionsplatten, Miles Laboratories, Naperville, USA

-Mikroskope:-Lichtmikroskop, Zeiss, Oberkochen

-Umkehrmikroskop Leitz-Diavert, Leitz, Wetzlar

-Fluoreszenzmikroskop, Zeiss, (Fluoreszenzfilter: 450-490 FT510 LP520 für FITC, BP365 FT395 LP397 für Hoechst 33.285)

-Elektronenmikroskop 109, Zeiss

-Minipetrischalen, Falcon/ Becton-Dickinson, Heidelberg

-Molekulargewichtsmarker: unmarkiert: BioRad

farbig markiert: Rainbow-Marker, Amersham

^{14}C-markiert: Amersham, Braunschweig

-Mouse-IgG- und Mouse-IgM-Kit, Miles

-Multitest-Objektträger, Flow, Meckenheim

-Narkoseether, Hoechst, Mannheim

-Nitrozellulose-Membran, BioRad

-Power-Supplies: LKB, Gräfeling und BioRad

-Röntgenfilm: X-ray-Film, Konica

-Rotoren: 50TI, SW45, Beckman, Stuttgart

TFT65, Kontron, Eching

-Szintillationscocktail Ready-Solv HP/b, Beckman

-Schüttler, Braun, Melsungen

-Taumler, Heidolph

-Trimmfräse, Reichert

-Ultramikrotom, Reichert

-Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal

-Zellkulturflaschen aus Plastik, Lux (Miles), Falcon, Greiner, Nürtingen

-Zellkulturplatten, Costar, Cambridge, MA, USA

-Zentrifugen: Christ Minifuge-2, Heraeus, Hanau

Christ Biofuge-A, Heraeus

Ultrazentrifuge L3-50, Beckman

2.3. Puffer und Lösungen

Alle Puffersubstanzen wurden, wenn nicht anders angegeben in H_2O bidest gelöst und der pH-Wert, falls erforderlich, mit HCl oder NaOH eingestellt.

Phosphat gepufferte Saline (PBS) pH7,4:

140mM	NaCl
2,5mM	Na_2HPO_4
1,5mM	KH_2PO_4
1,0mM	$CaCl_2$
0,5mM	$MgCl_2x6H_2O$

Für die Radioimmunpräzipitation (RIP):

RIP-Grundpuffer pH7,6:

20mM	Tris
100mM	NaCl
1mM	EDTA
2% (w/v)	Rinderserumalbumin

Triton-Lösung A:

1% (v/v)	TritonX-100
0,1% (w/v)	Desoxycholat
0,1% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)

-in RIP-Grundpuffer

Triton-Lösung B:

1% (v/v)	TritonX-100
0,5% (w/v)	Desoxycholat
0,1% (w/v)	SDS

-in RIP-Grundpuffer

0,2% Triton-Lösung C:

0,2% (v/v)	TritonX-100

-in RIP-Grundpuffer ohne Rinderserumalbumin

Extraktionspuffer (nach Fey *et al.*, 1984):

250mM	NH_4Cl
300mM	Saccharose
10mM	PIPES (pH6,8)
3mM	$MgCl_2$
1,2mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
0,5% (v/v)	TritonX-100

25% Saccharose-Puffer:

25% (w/v)	Saccharose
1% (v/v)	TritonX-100
0,5% (w/v)	Desoxycholat
0,1% (w/v)	SDS

-in RIP-Grundpuffer

Probenpuffer pH6,8:

2% (w/v)	SDS
0,625mM	Tris
10% (v/v)	Glycerol
0,01% (w/v)	Bromphenolblau
5% (v/v)	Mercapto-Ethanol

Für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Trenngelpuffer (2x) pH8,8:

0,75M	Tris

Sammelgelpuffer (2x) pH6,8:

0,25M	Tris

Elektrodenpuffer (10x) pH8,3:

0,25M	Tris
1% (w/v)	SDS
1,925M	Glyzin

Fixierer für Gele:
30% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig
60% (v/v) H_2O bidest

Acrylamid-Lösung:
40% (w/v) Acrylamid
1% (w/v) Bisacrylamid

PPO-Lösung:
22,2% (w/v) Diphenyloxazol (PPO)
-in Dimethylsulfoxyd (DMSO)

Für Immunelektronenmikroskopie:

Puffer M:
50mM NH_4Cl
0,05% (w/v) Saponin
0,1% (w/v) Rinderserumalbumin
-in PBS

Tris-HCl-Puffer pH7,6:
0,1M Tris

Cacodylatpuffer pH7,2:
50mM Dimethylarsinsäure-Na-Salz
50mM KCl

Fixierlösungen:
a)
2% (w/v) Paraformaldehyd
0,01% (w/v) Glutaraldehyd
-in PBS
b)
1,5% (w/v) Glutaraldehyd
-in Cacodylatpuffer

Substratlösung pH7,6:

0,1% (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin-HCl

10mM Imidazol

0,03% (v/v) H_2O_2

-in 0,1M Tris-HCl-Puffer

Osmium-Lösung:

2% (w/v) OsO_4

Thiocarbohydrazit-Lösung:

gesättigte Lösung, filtriert

Für Immunoblotting:

Renaturierungspuffer pH8,4:

50mM NaCl

10mM Tris-HCl pH7,0

4M Harnstoff

0,1mM Mercapto-Ethanol

Blotting-Puffer:

1)

25mM Tris

193mM Glyzin

20% (v/v) Methanol

2) (nach Otter *et al.*, 1987)

50mM Tris

386mM Glyzin

0,01% (w/v) SDS

20% (v/v) Methanol

Acetatpuffer pH5,0:

1M Na-Acetat

-pH mit Essigsäure eingestellt

Blockierungspuffer:
2% (w/v) Magermilchpulver
0,2% (v/v) Tween-20
-in PBS

PBS-Tween (Waschpuffer):
0,1% (v/v) Tween-20
-in PBS

PBS-NaCl (Waschpuffer):
1M NaCl
-in PBS

Amidoschwarz-Lösung:
0,1% (w/v) Amidoschwarz 10B
in Methanol/Eisessig/H_2O (5:2:13)

Substratlösung:
Lösung A: 20mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 5ml Dimethylformamid gelöst und für 5min im Dunkeln stehen gelassen.
Lösung B: 5ml 1M Acetatpuffer pH5,0 in 95ml H_2O bidest.
Lösung A unter vorsichtigem Schütteln in Lösung B gießen und im Dunkeln filtrieren, anschließend 50μl H_2O_2 zugeben.

sonstige Puffer und Lösungen:

TEN-Puffer pH7,4:
150mM NaCl
10mM Tris
1mM EDTA

DABCO-Puffer pH8,6:
2,5% (w/v) Diazobicyclo(2.2.2.)octan (DABCO)
10/ (v/v) PBS
-in Glycerol

Pepton-Lösung:
10% (w/v) Pepton

Fusionslösung:

50% (w/v) Polyethylenglykol (PEG) 4000

7,5% (v/v) DMSO

-in RPMI1640-Medium, serumfrei, sterilfiltriert

0,34M Saccharose in H_2O bidest, steril

1% (w/v) Agarose in physiologischer Kochsalzlösung

2.4. Zellkulturmedien und Zusätze:

-Minimal Essential Medium (MEM), für Kulturzellen, Serva, Heidelberg
-RPMI1640, für Hybridomzellen, Serva
-Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (DMEM), ohne Methionin und Cystein (Markierungsmedium für die Radioimmunpräzipitation), Medienküche, BFA-V, Tübingen
-Fetales Kälberserum (FCS), Seromed, München
-Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin-Konzentrat (HAT), Boehringer, Mannheim
-Hypoxanthin/Thymidin-Konzentrat (HT), Boehringer
-Glutamin, Serva
-Penicillin, Gruenenthal, Stolberg
-Streptomycin, Sarbach
-^{35}S-Methionin und ^{35}S-Cystein, Amersham

2.5. Seren, Antiseren und Antikörper

-Kaninchenserum, eigene Gewinnung

-Ziegenserum, eigene Gewinnung

-Kaninchen-anti-Maus-IgG, Cappel, Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA

-FITC-Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Fab-Fragmente, Cappel

-FITC-Ziege-anti-Maus-IgG, Cappel und Miles

-PO-Ziege-anti-Maus-IgG, Dianova, Hamburg (verwendet für Immunperoxidasereaktionen auf fixierten Zellen)

-PO-Ziege-anti-Maus-IgG, BioRad (verwendet für Immunoblotting)

-anti-Vimentin, Boehringer

-anti-Aktin, Amersham

-anti-Tubulin, Amersham

-anti-LDV_{AGIA}-Serumpool: Pool von Seren, die 6 Monate nach der Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA} gewonnen wurden. Titer in der indirekten Immunfluoreszenz auf infizierten Makrophagen: 6400

-anti-Golgi-Serumpool: Pool von Seren, die 19 Tage nach Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA} gewonnen wurden. Titer in der indirekten Immunfluoreszenz auf Schä-T-D-Zellen: 3200

-D56-1-X: Monoklonaler IgG_{2a}-Antikörper gegen ein Oberflächenantigen von Sac-Zellen (Weiland & Thiel, 1985), reagiert nicht mit Golgi-Antigen

-K21-4-1: Monoklonaler IgG_{2a}-Antikörper gegen Golgi-Antigen aus einer nicht in dieser Arbeit beschriebenen Fusion

2.6. Chemikalien

Aceton, Merck, Darmstadt
Acrylamid, 2xkrist., reinst, Serva, Heidelberg
Agarose, Seakem ME, Heidinger, Stuttgart
Albumin aus Rinderserum, reinst, Serva
Amidoschwarz, Serva
3-Amino-9-Ethylcarbazol, Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid, p.A., Merck
Araldit M, Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau-Na-Salz, reinst, Serva
Calciumchlorid, p.A., Merck
Colcemid, Serva
Cytochalasin B, Serva
Desoxycholat, reinst, Serva
Diaminobenzidin, Sigma
1,4-Diazobicyclo(2.2.2.)oktan (DABCO), zur Synthese, Merck
Dimethylarsinsäure-Na-Salz, zur Synthese, Merck
Dimethlformamid, Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO), getrocknet, p.A., Merck
2,5-Diphenyloxazol (PPO), Sigma
EDTA, p.A., Merck
Essigsäure, min. 96%, Merck
Ethanol, technisch, vergällt
Glutamin, Serva
Glutaraldehyd, rein, Serva
Glycerol (87%), p.A., Merck
Glycin, p.A., Merck
Harnstoff, p.A., Merck
Hoechst 33.285, Riedel-de-Haën, Seelze, Hannover
Imidazol, krist. Grad III, Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat, p.A., Merck
Magermilchpulver, Neuform, Herrenberg
Magnesiumchlorid, p.A., Merck
Mercapto-Ethanol, zur Synthese, Merck
Methanol, p.A., Merck
N,N,-Methylenbisacrylamid, 2xkrist., reinst, Serva
Monensin, Sigma

Narkoseether, Hoechst, Frankfurt

Natriumacetat, krist. p.A., Merck

Natriumchlorid, p.A., Merck

Natriumdodecylsulfat (SDS), 2xkrist. p.A., Serva

di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, p.A., Merck

Osmiumtetroxid, Agar Aids, Cambridge

Paraformaldehyd, Fluka

Pepton, Serva

Perhydrol (H_2O_2), 30%, p.A., Merck

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma

PIPES, Sigma

Polyethylenglykol (PEG) 4000, für die Gaschromatografie, Merck

Pristan (2,6,10,14,-Tetramethylpentadecan), 96%, Ega, Steinheim

Propidiumiodid, Sigma

Rhodamin 123, Kodak, USA

Saccharose, reinst, Serva

Saponin, weiß, rein, Merck

Thiocarbohydrazit, p.A., Fluka

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, p.A., Merck

TritonX-100, rein, Serva

Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat), Sigma

3. Methoden

3.1. Infektion von Mäusen mit LDV_{AGIA}

Die Infektion von STU-Mäusen wurde in der Regel intramuskulär vorgenommen. Die Mäuse wurden dazu mit Narkoseether betäubt und das Virus in einem Volumen von 100µl in den Hinterschenkel injiziert.

3.2. Serumgewinnung

Die Blutgewinnung erfolgte nach Narkose durch Punktion des Orbitalplexus. Nach der Gerinnung (ca. 1h bei 23°C) wurde der Blutkuchen sedimentiert (Christ-Minifuge, 5000Upm, 4°C, 10min), das Serum abgenommen und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

3.3. Nachweis der Infektion mit LDV_{AGIA}

3.3.1. Bioassay

Für den Nachweis von LDV_{AGIA} wurde ein kürzlich beschriebener Bioassay angewendet (Weiland & Weiland, 1985), der auf der regelmäßigen Entwicklung von Autoantikörpern gegen Golgi-Antigen von Kulturzellen verschiedener Spezies und gegen Oberflächenantigen der Moloney Sarkomvirus transformierten Tumorzellinie Sac beruht. Andere Nachweisverfahren, wie z.B. Plaque-Tests, waren nicht durchführbar, da das Virus in gängigen Kulturzellen nicht vermehrt wird und in permissiven Makrophagenkulturen nicht zu makroskopisch oder mikroskopisch erkennbaren Veränderungen führt. Der Titer von LDV_{AGIA} wurde bestimmt durch Inokulation von Virusproben, die in PBS+10% FCS in 10er Stufen verdünnt wurden, in normale STU-Mäuse. Pro Verdünnungsstufe wurden 2-4 Tiere eingesetzt. Zwei Wochen nach der Infektion wurde Serum von jedem Individuum gesammelt und auf die Gegenwart von Autoantikörpern getestet. Die Bestimmung der Golgi-Antikörper erfolgte in der

indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Schä-T-D-Zellen (s.3.7.), die Bestimmung der zytotoxischen Antikörper in einem Komplement-abhängigen, Antikörper-vermittelten Chrom-Freisetzungstest (Weiland *et al.*, 1984).

3.3.2. Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum

Vergleichend wurde der Titer von LDV_{AGIA} durch Bestimmung der Aktivität des Serumenzyms Laktatdehydrogenase ermittelt. Auf der durch LDV-Infektion bedingten Erhöhung der LDH-Aktivität basierte bislang nahezu ausschließlich der Nachweis einer Infektion mit diesem Virus (Riley *et al.*, 1960).

Für den Test wurde Serum, das vor und 14 Tage nach der Infektion gewonnen worden war, für die LDH-Bestimmung eingesetzt. Gemessen wurde photometrisch die Zunahme der Adsorption von NADH bei 340nm in der Anwesenheit von Laktat (50mM) und NAD (7mM) bei pH8,9 (Sigma LD-L-Reagenz) nach Zugabe der Testproben.

3.3.3. Virusgewinnung

Für die Gewinnung von Virus wurden 100 Mäuse intramuskulär mit $10^{1,5}ID_{50}$/Maus infiziert. Nach 48 bzw. 62 Stunden wurde das Serum der Tiere gewonnen, vereinigt, portioniert und bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Infektiosität im Bioassay (3.3.1.) ergab Werte von rund $10^{11}ID_{50}$/ml.

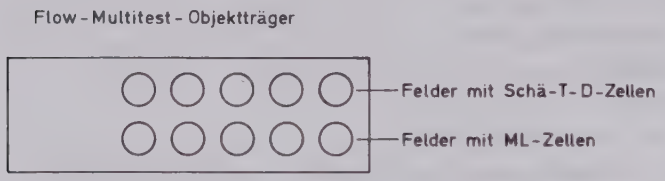
3.4. Zellkulturen auf Objektträgern

Aussaat:

Alle für die Immunfluoreszenz verwendeten Zellinien wurden in Vierkantflaschen aus Glas mit MEM+10% FCS kultiviert. Für die routinemäßigen Untersuchungen von Seren und Kulturüberständen wurden zum Nachweis von Antikörpern gegen zelluläre Strukturen Schä-T-D- und ML-Zellen verwendet, die besonders gut Golgi- bzw. Zytoskelett-assoziiertes Antigen präsentieren (s. Schema 1). Zur Herstellung von Kulturen auf Objektträgern wurden die Zellen mit EDTA - Trypsin abgelöst, sedimentiert (Christ-Minifuge, 2000Upm, 10min, 4°C), in MEM+10% FCS suspendiert und gezählt. Anschließend folgte die Verteilung der Zellen in einer Konzentration von $1x10^5$

Zellen/ml auf Flow-Multitest-Objektträgern (50µl/Feld) und Inkubation der Kulturen für 24h bei 37°C und 5% CO_2 in einer feuchten Kammer.

Schema 1: Zellkulturen auf Objektträgern



Fixierung:

Für routinemäßige Serumuntersuchungen auf Autoantikörper und für das Screening von Kulturüberständen erfolgte die Fixierung der Zellen wie folgt:

-kurzes Eintauchen der Objektträger in PBS bei 37°C
-kurzes Eintauchen in PBS bei 4°C
-Fixierung in Aceton/Methanol (1:1) bei -20°C für 10min
-Trocknen der Objektträger bei 23°C

Bis zu ihrer Verwendung wurden die Objektträger bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen und Trocknen der Zellen bei 23°C wurden die Objektträger 5min in PBS bei 23°C rehydriert und waren damit für die Immunfluoreszenz gebrauchsfertig.

3.5. Infektion von Makrophagenkulturen *in vitro* mit LDV_{AGIA}

Gewinnung von Makrophagen:

Für die Infektion eigneten sich, wie Vorversuche ergeben hatten, am besten Peritonealmakrophagen von Pepton-stimulierten Balb/c-Mäusen (10% Pepton in Aqua dest., 1ml pro Maus, 4 Tage vor der Gewinnung intraperitoneal injiziert).

Zur Makrophagengewinnung wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und mit Ethanol für 1min oberflächensterilisiert. Nach Eröffnung des Fells wurde der Bauchraum 2mal mit je 5ml einer 0,34M Saccharoselösung gespült. Die so gewonnenen Peritonealzellen wurden sedimentiert (Christ-Minifuge, 1500Upm, 10min, 4°C) und in einer Konzentration von $6x10^6$ Zellen/ml in MEM+10% FCS suspendiert.

Aussaat:

Die Makrophagen wurden auf Flow-Multitest-Objektträgern ausgesät (50µl/Feld) und bei 37°C und 5% CO_2 in einer feuchten Kammer für ca. 8h inkubiert.

Infektion:

Der Überstand der Objektträgerkulturen wurde abgesaugt und durch je 50µl einer LDV-Suspension mit 10^9 ID_{50}/ml in MEM+10% FCS pro Feld ersetzt. Danach wurden die Kulturen wie oben beschrieben für 12h weiterinkubiert.

Fixierung und Lagerung:

Für routinemäßige Serumuntersuchungen und für das Screening von Kulturüberständen auf Virus-Antikörper wurden die infizierten Makrophagenkulturen wie bereits beschrieben (s.3.4.) in Aceton/Methanol fixiert und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

3.6. Infektion von Makrophagen *in vivo* mit LDV_{AGIA}

Neben der *in vitro*-Infektion von Makrophagenkulturen wurde versucht, diese Zellen bereits *in vivo* zu infizieren. Dafür erfolgte die Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA} (10^5 ID_{50}) intramuskulär oder intraperitoneal. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion (6, 12, 18, 24, 72h p.i.) wurden die Mäuse getötet und die Makrophagen durch Ausspülen des Peritoneums mit 0,34M Saccharose isoliert. Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer Konzentration von 2-$5x10^6$/ml in MEM+10% FCS auf Flow-Multitest-Objektträgern mit einer anschließenden Inkubation für 5h bei 37°C

und 5% CO_2. Anschließend wurden die Makrophagen in Aceton/Methanol für 10min bei -20°C fixiert, getrocknet und bis zur Verwendung in der Immunfluoreszenz bei -70°C gelagert.

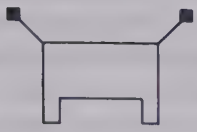
3.7. Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen zelluläre Strukturen und der Nachweis von virusspezifischen Antikörpern in Seren, Ascites-Flüssigkeit und in Kulturüberständen von Hybridomkulturen erfolgte grundsätzlich mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Zellen. Diese Methode hat gegenüber anderen immunologischen Nachweisverfahren (z.B. ELISA) den Vorteil, daß die von Antikörpern erkannten zellulären Strukturen (Golgi-Apparat, Zytoskelett, Mitochondrien, Kern, virusinfizierte Zellen) durch die mikroskopische Auswertung gezielt bestimmt werden konnten.

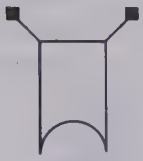
Durchgeführt wurde die Immunfluoreszenz an fixierten Zellen auf Flow-Multitest-Objektträgern. Die bei -70°C gelagerten Objektträger wurden bei 23°C aufgetaut, mit einem Kaltluftfön von Kondenswasser getrocknet und in PBS bei 23°C für 5min rehydriert. Nach dem Trocknen der Räume zwischen den 10 Feldern eines Objektträgers erfolgte die Zugabe des antigenspezifischen Antikörpers (Serum, Ascites, Kulturüberstand; unverdünnt oder verdünnt in PBS+2% Kaninchenserum, 20-25µl/Feld) mit anschließender Inkubation für 16-18h bei 23°C in einer feuchten Kammer. Nachfolgend wurden die Objektträger 3mal 5min in PBS bei 23°C gewaschen, nachdem zuvor die Felder einzeln mit PBS abgespült worden waren, um ein Überlaufen der einzelnen Antikörper auf Nachbarfelder zu verhindern. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper von der Ziege für 45min bei 23°C. Nach erneutem 3maligen Waschen der Objektträger in PBS wurde auf die Zellen ein Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO-Puffer), der das Ausbleichen unter Lichteinwirkung verhindert (Johnson *et al.*, 1982), gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Zur Anfärbung der Zellkerne enthielt der Puffer 2µg/ml Propidiumiodid. Die Auswertung der Testansätze erfolgte mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop.

Im nachfolgenden wurden in Schemata zur Immunfluoreszenz

folgende Symbole verwendet, wobei für den nachzuweisenden Parameter ausgefüllte Zeichen verwendet wurden:



FITC-gekoppelter Antikörper von der Ziege gegen Kaninchen-IgG



FITC- oder Peroxidase-gekoppelter Antikörper von der Ziege gegen Maus-IgG

subklassenspezifischer Antikörper vom Kaninchen

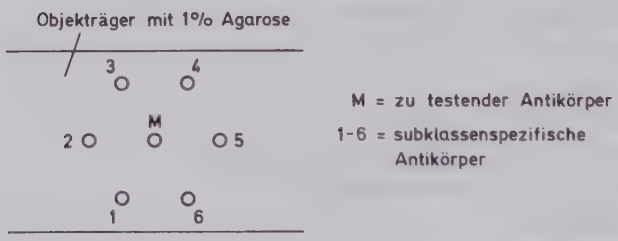
antigenspezifischer Antikörper von der Maus

an den Objektträger gebundenes zelluläres oder virales Antigen

3.8. Subklassenbestimmungen

Die Subklassenbestimmung monoklonaler Antikörper in Kulturüberständen erfolgte unter Anwendung der Doppel-Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony (Ouchterlony & Nilsson, 1978). Dazu wurden Objektträger mit 1% Agarose in physiologischer Kochsalzlösung beschichtet und rosettenförmig Löcher zur Aufnahme der Proben ausgestanzt (s.Schema 2). In der Mitte wurde, in kurzem Abstand, Kulturüberstand 4-5mal einpipettiert (je 5µl), die umliegenden 6 Löcher erhielten subklassenspezifische Antikörper (je 5µl Kaninchen-anti-IgG_1, -IgG_{2a}, -IgG_{2b}, -IgG_3, -IgM,-IgG_{gesamt} von Miles). Die Testansätze wurden in einer feuchten Kammer bei 23°C im Dunkeln mindestens 24h bis zur Ausbildung von spezifischen Präzipitationslinien inkubiert.

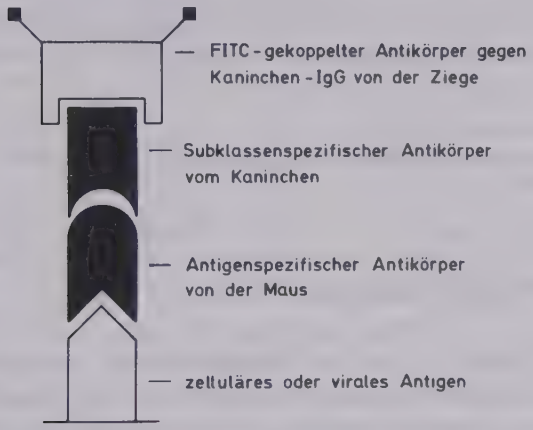
Schema 2: Subklassenbestimmung durch Doppel-Immundiffusion



Subklassenbestimmungen bei polyklonalen Seren und bei Ascitesflüssigkeit, die außer den monoklonalen Antikörpern noch weitere γ-Globuline der Maus zu einem gewissen Anteil enthalten, erfolgten mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (s.Schema 3). Dabei wurden die zu testenden Proben 1:150 in PBS+2% Ziegen-Normalserum verdünnt und auf je einen Objektträger (Flow-Multitest-Objektträger) mit den Targetzellen verteilt und wie beschrieben (s.3.7.) inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte im zweiten Schritt die Zugabe von subklassenspezifischen Antiseren vom Kaninchen (s.o.), die 1:200 in PBS+5% Ziegenserum verdünnt

wurden. Nach einer Inkubation von 2h bei 23°C wurden die Objektträger erneut gewaschen, ein FITC-gekoppelter, gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper von der Ziege (Cappel) zugegeben und wie beschrieben (s.3.7.) inkubiert. Nach Zugabe von DABCO-Puffer erfolgte die Auswertung mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop.

Schema 3: Subklassenbestimmung in der indirekten Immunfluoreszenz

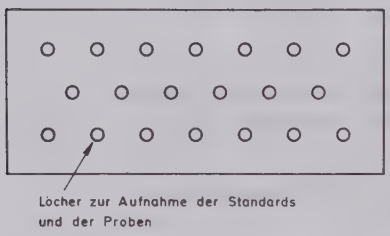


3.9. Bestimmung der IgG- und IgM-Konzentrationen im Serum durch radiale Immundiffusion

Zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort nach LDV-Infektion wurden die IgG- und IgM-Konzentrationen vor und nach der Infektion bestimmt. Das geschah durch radiale Immundiffusion mit einem kompletten Testkit von Miles (s.Schema 4). Eine vorbeschichtete Platte enthält einen gegen Maus-IgG bzw. -IgM gerichteten Antikörper in Agarose. Ausgestanzte Löcher werden mit 5μl des zu testenden Serums (1:10 in Normal-Schafserum verdünnt) gefüllt. In je drei Löcher der Platte werden 5μl der mitgelieferten IgG- bzw. IgM-Standards pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 48h werden die Durchmesser der Präzipi-

tationsringe gemessen. Durch Erstellung einer Eichkurve lassen sich jetzt die Immunglobulin-Konzentrationen der einzelnen Serumproben bestimmen.

Schema 4: Immunglobulin-Konzentrationsbestimmung durch radiale Immundiffusion



3.10. Titerbestimmung von Autoantikörpern im Serum

Um den Verlauf der Autoantikörperproduktion nach LDV_{AGIA}-Infektion zu untersuchen, wurden Seren vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion gewonnen, titriert und in der indirekten Immunfluoreszenz an fixierten Schä-T-D- und ML-Zellen getestet. Zur Untersuchung kamen zwei Serumserien von Mäusen, die mit LDV_{AGIA} in verschiedenen Konzentrationen infiziert worden waren:

1.Serie:

STU-Mäuse, infiziert mit einem Viruspool, der von Mäusen 48h nach der Infektion gewonnen wurde und eine hohe Konzentration an LDV_{AGIA} besaß (10^{11} ID_{50}/ml). Infektionsdosen: 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 und 1 ID_{50} pro Maus.

2.Serie:

STU-Mäuse, infiziert mit einem virushaltigen Serumpool, der 14 Tage nach der Infektion gewonnen worden war (10^7 ID_{50}/ml). Infektionsdosen: 10^4, 10^3, 10^2, 10 und 1 ID_{50}. Für die Titration in der Immunfluoreszenz wurden die Seren in 2er-Stufen 1:150 bis 1:2400 mit PBS+2% Kaninchenserum verdünnt und auf den antigenhaltigen fixierten Kulturzellen für 16h bei 23°C inkubiert. Der

Antikörpertiter gegen Golgi-Antigen wurde auf Schä-T-D-, der Titer der Antikörper gegen Zytoskelettelemente, Mitochondrien- und Kern-assoziierte Antigene auf ML-Zellen bestimmt.

In einer dritten Serie wurden Gruppen von jeweils 5 Mäusen mit verschiedenen Viruskonzentrationen infiziert, um, in Abhängigkeit von der Virusdosis, den frühestmöglichen Zeitpunkt für den Nachweis der anti-Golgi-Autoantikörper zu bestimmen.
Infektionsdosen: $10^{7,5}$, $10^{5,5}$, $10^{3,5}$, $10^{1,5}$, $10^{0,5}$, $10^{0,05}$/Maus.
Seren wurden vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion gewonnen (5,6,7,9,12 und 16 Tage p.i.) und, 1:150 in PBS+2% Kaninchenserum verdünnt, in der indirekten Immunfluoreszenz auf Schä-T-D-Zellen zum Nachweis von Golgi-Antikörpern eingesetzt.

3.11. Produktion monoklonaler Autoantikörper

Da mit polyklonalem Serum von infizierten Mäusen die Charakterisierung der einzelnen Autoantigene kaum möglich ist, wurde versucht, in einer Reihe von Fusionen monoklonale Autoantikörper gegen die zellulären Antigene und vor allem gegen Golgi-Antigen zu produzieren. Da nicht bekannt war, welcher Zeitpunkt nach der Infektion optimal für die Herstellung monoklonale Antikörper produzierender Hybridome war, wurden Fusionen mit Milzzellen LDV_{AGIA}-infizierter Mäuse zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion durchgeführt.

Stimulierung Autoantikörper-produzierender Zellen durch Infektion:

STU-Mäuse wurden mit einer 10^{-4}-Verdünnung eines LDV_{AGIA}-Viruspools infiziert, der 65h nach der Infektion gewonnen worden war und 10^{11} ID_{50}/ml enthielt.

Myelomzellen:

Für die Fusionen wurden Myelomzellen der Linie SP2/0-Ag14 (Shulman *et al.*, 1978) verwendet, die selbst keine Immunglobulinketten produzieren. Die Zellen wurden in RPMI+15% FCS in Plastikflaschen oder in Roux-Glasflaschen kultiviert. Zur Ernte wurden die Zellen, die sich an der Oberfläche stark anhefteten,

mit EDTA-Trypsin abgelöst, sedimentiert (Christ-Minifuge, 1000Upm, 10min, 4°C) und in frischem RPMI+15% FCS aufgenommen.

Vorbereitung der Fusion:

Um ein optimales Wachstum der Hybridomzellen zu erreichen, hat sich die Zugabe von "feeder"-Zellen bewährt. Besonders eignen sich hierfür Peritonealmakrophagen von Mäusen. Neben der Sekretion von Wachstumsfaktoren und immunstimulierenden Faktoren phagozytieren Makrophagen auch die Zelltrümmer abgestorbener, nichtfusionierter Milz-und Myelomzellen (Hämmerling & Hämmerling, 1981). Die Makrophagen wurden aus dem Bauchraum gesunder, unbehandelter Mäuse isoliert. Dazu wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, in Ethanol oberflächensterilisiert und der Bauchraum 2mal mit je 5ml einer 0,34M Saccharoselösung ausgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden sedimentiert (Christ-Minifuge, 1500Upm, 10min, 4°C) und in HAT-Medium aufgenommen. 144ml HAT-Medium mit $4x10^4$ Makrophagen/ml wurden auf 6 24-well-Platten (Costar) am Tage vor der Fusion verteilt (1ml/Napf) und die Platten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Fusion:

Für die Fusion mit den Milzzellen einer infizierten Maus (ca. $1x10^8$ Zellen) wurden $5x10^7$ Myelomzellen geerntet, sedimentiert (Christ-Minifuge, 1000Upm, 10min, 4°C), in 15ml RPMI+15% FCS aufgenommen und bei 37°C gelagert.

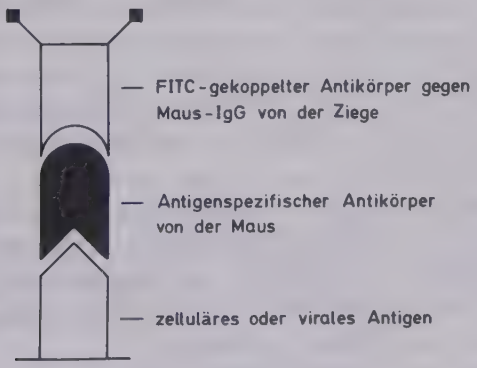
Der Milzspender wurde durch zervikale Dislokation getötet und in Ethanol oberflächensterilisiert. Nach steriler Entnahme wurde die Milz in serumfreiem RPMI gewaschen, Bindegewebe und Fett entfernt. Das Organ wurde mit der Schere zerteilt und mit dem Stempel einer Spritze durch Gaze (100mesh) in 15ml serumfreies RPMI-Medium passiert. Myelom- und Milzzellen wurden sedimentiert (Christ-Minifuge, 1500Upm, 10min, 23°C) und jeweils in 5ml serumfreiem RPMI-Medium suspendiert. Nach dem Mischen der Zellen und erneuter Sedimentation (Christ-Minifuge, 1500Upm, 10min, 23°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet durch Schütteln aufgelockert. Unter weiterem Schütteln erfolgte über 1min die tropfenweise Zugabe von 1ml einer 50%igen PEG-Lösung (PEG 4000, Merck) und die langsame Verdünnung des Fusionsansatzes mit 10ml

serumfreiem RPMI-Medium. Nach einer Inkubation von 5min bei 23°C wurden die Zellen sedimentiert (Christ-Minifuge, 1500Upm, 10min, 23°C), in 7ml HAT-Medium aufgenommen und auf die tags zuvor mit Makrophagen beschichteten 24-well Platten verteilt (50µl/Napf). Bis zur Untersuchung auf Wachstum wurden die Platten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am vierten Tag nach der Fusion erfolgte die Zugabe von 1ml HAT-Medium pro Napf.

Screening:

Zehn bis 14 Tage nach der Fusion wurden die Platten auf Wachstum untersucht. Aus Näpfen mit gutem Zellwachstum - die Zellen bedeckten etwa die Hälfte der Fläche - wurde 1ml Kulturüberstand für das Screening entnommen und durch HT-Medium ersetzt. Die Untersuchung der Überstände in der Immunfluoreszenz erfolgte routinemäßig auf fixierten Schä-T-D- und ML-Zellen zum Nachweis von Autoantikörpern gegen zelluläre Strukturen, sowie auf fixierten, infizierten Makrophagen zum Nachweis von Virusantikörpern (s.Schema 5).

Schema 5: Screening der Kulturüberstände



Klonierungen:

Hybridomkulturen, deren Überstände die gewünschten Antikörper enthielten, wurden sofort kloniert, um ein Überwachsen der Antikörper-produzierenden Zellen durch nichtproduzierende Kulturen zu verhindern. Dazu wurden die Zellen gut suspendiert, je nach Dichte des Zellwachstums 3-7µl Zellsuspension entnommen (ca. 300 Zellen) und in 25ml Klonierungsmedium (HT-Medium), das als "feeder"-Zellen $2x10^4$ Makrophagen/ml enthielt, gegeben. 20ml dieser Verdünnung wurden auf eine 96-well Platte verteilt (200µl/Napf) und die restlichen 5ml mit 20ml Klonierungsmedium aufgefüllt. Nach dem Verteilen auf eine zweite 96-well Platte (200µl/Napf) wurde nach Zugabe von 15ml Medium zum Rest noch eine dritte Verdünnung ausplattiert. Nach 2 bis 3 Wochen wurden von den Platten, in denen nach der Poisson-Verteilung Klonalität sichergestellt war (Hämmerling & Hämmerling, 1981), Überstände wachsender Klone gewonnen und zum Screening in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Kulturzellen eingesetzt. Um die Klonalität sicherzustellen und die Stabilität der Klone zu testen, wurden positive Kulturen in der beschriebenen Weise erneut kloniert.

Parallel zu den Klonierungen wurden alle positiven Kulturen auf 24-well Platten in HT-Medium weiterkultiviert und Aliquots der Zellen in RPMI+15% FCS+10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

Ascites-Produktion:

Die Produktion von Ascites in Mäusen stellt eine Möglichkeit dar, innerhalb kurzer Zeit monoklonale Antikörper in hoch konzentrierter Form zu erhalten.

Da die Myelomzellen ursprünglich von Balb/c-Mäusen stammen, die Milzzellen aber von STU-Mäusen, besitzen die fusionierten Hybridome die Histokompatibilitätsantigene beider Mäusearten. Deswegen wurden für die Ascites-Produktion die beiden Mäusestämme gekreuzt und nur Tiere der F_1-Generation verwendet.

Zur Steigerung der Ascitesproduktion wurde den Mäusen 0,5ml Pristan (2,6,10,14-tetramethyl-pentadekan) intraperitoneal injiziert. Sieben bis 14 Tage später wurden etwa $1x10^6$ Hybridomzellen transplantiert. Dazu wurden die Zellen eines Klons geerntet, sedimentiert (Christ-Minifuge, 1000Upm, 10min, 4°C) und in serum-

freiem RPMI-Medium in einer Konzentration von $2x10^6$ Zellen/ml suspendiert. Pro Maus wurden 0,5ml dieser Zellsuspension intraperitoneal injiziert. Die nach 1 bis 2 Wochen produzierte Ascites-Flüssigkeit wurde von den mit Ether narkotisierten Tieren durch Einstechen einer Kanüle in den Bauchraum und Aufsammeln der austretenden Flüssigkeit gewonnen. Die Ascites-Flüssigkeit wurde zentrifugiert (Christ-Minifuge, 3000 Upm, 15min, 4°C), um Zellen und eventuell vorhandene Erythrozyten zu entfernen, portioniert und bei -20°C gelagert. Nach Möglichkeit erfolgten von jedem Tier im Abstand von 2 bis 3 Tagen mehrmalige Entnahmen von Ascites-Flüssigkeit.

Der Antikörpertiter in der Ascites-Flüssigkeit wurde in einer Verdünnungsreihe in PBS mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Zellen (Schä-T-D, ML oder infizierten Makrophagen) bestimmt.

3.12. Charakterisierung der monoklonalen Autoantikörper

3.12.1. Spezifität der Autoantikörper

Die Identifizierung der durch die monoklonalen Autoantikörper erkannten zellulären Strukturen erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz auf fixierten Schä-T-D- und ML-Zellen. Die Autoantikörper wurden dafür gleichzeitig auf normalen unbehandelten Zellen inkubiert und parallel auf Zellen, in denen nach Einwirkung bestimmter Reagenzien subzelluläre Strukturen typische Veränderungen aufwiesen (Golgi-Apparat, Zytoskelett-Antigene); oder die Identifizierung der reagierenden Antigene erfolgte durch Vergleich des Reaktionsmusters von Antikörpern und Spezialfärbungen (Mitochondrien, Kerne).

Antikörper gegen Golgi-assoziiertes Antigen:

Vom Golgi-Apparat ist bekannt, daß er kernnah lokalisiert ist (Beams, 1968) und daß die Organelle in mitotischen Zellen bzw. in Monensin- bzw. Colcemid-behandelten Zellen aufgelöst ist (Lin & Queally, 1982; Louvard *et al.*, 1982; Hiller & Weber, 1982). Daher

wurden Schä-T-D- und ML-Zellen 24h nach der Aussaat auf Flow-Multitest-Objektträger für 4h mit 10µM Monensin oder für 16h mit 0,5µg/ml Colcemid behandelt, anschließend auf übliche Weise in Aceton/Methanol (1:1) bei -20°C fixiert, getrocknet und in der indirekten Immunfluoreszenz zur Spezifitätsbestimmung der Golgi-Antikörper eingesetzt. Für die Untersuchungen von Mitosephasen wurden unbehandelte Zellen nach 24h fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Da nach der kurzen Wachstumsphase die Zellen noch stark proliferierten, war es möglich, zahlreiche Mitosestadien zu beobachten, so daß auf eine zusätzliche Synchronisation der Zellen (z.B. durch einen doppelten Thymidinblock) verzichtet werden konnte.

Antikörper gegen Zytoskelett-assoziierte Antigene:

Die Elemente des Zytoskeletts lassen sich in drei Gruppen einteilen: 1) Mikrotubuli (Baustein: Tubulin) 2) Mikrofilamente (Baustein: Aktin) und 3) Intermediärfilamente (bestehen je nach Zelltyp aus Vimentin (Fibroblasten und viele Kulturzellen), Desmin (Muskelzellen), Keratin (Epithelzellen), Neurofilamenten (Neuronen) oder fibrillärem saurem Gliaprotein (Gliazellen)). Die Unterscheidung dieser Elemente wird durch Behandlung der Zellen mit verschiedenen Reagenzien möglich. Eine Depolymerisation der Mikrotubuli wird durch Colcemidbehandlung der Zellen erreicht (10µg/ml Colcemid für 17h bei 37°C und 5% CO_2 auf Flow-Multitest-Objektträgern mit ML-Zellen, 50µl/Feld). Mikrofilamente dagegen lassen sich durch Cytochalasin B auflösen (5µg/ml Cytochalasin B für 2h bei 37°C und 5% CO_2, Flow-Multitest-Objektträger mit ML-Zellen, 50µl/Feld). Intermediärfilamente werden durch diese Behandlung nicht depolymerisiert, aber sie verlieren ihre räumliche Organisation nach Colcemidbehandlung, kollabieren zu kernnah orientierten Schlingen und lassen sich so nachweisen (Hormia *et al.*, 1982).

Zusätzlich wurden zum Vergleich der Reaktionsmuster parallel zu den Proben monoklonale Antikörper gegen Actin und Tubulin zum Nachweis von Mikrofilamenten bzw. Mikrotubuli und Antikörper gegen Vimentin, das bei den meisten in dieser Untersuchung verwendeten Kulturzellen Baustein der Intermediärfilamente ist, eingesetzt.

Antikörper gegen Mitochondrien-assoziierte Antigene:

Die Reaktion monoklonaler Antikörper gegen Mitochondrien-assoziierte Antigene wurde durch den Vergleich des Reaktionsmusters mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (Kodak), der spezifisch an Mitochondrien unfixierter, vitaler Zellen bindet (Johnson *et al.*, 1981), in der Immunfluoreszenz an ML-Zellen bestimmt.

Dazu wurden die Zellen auf Flow-Multitest-Objektträgern 24h nach der Aussaat für 10min bei 37°C mit Rhodamin 123 (5µg/ml in MEM, 50µl/Feld) inkubiert. Nach einem Waschschritt in PBS (1min bei 23°C) erfolgte die Auswertung der Reaktion im Fluoreszenzmikroskop.

Antikörper gegen Kern-assoziierte Antigene:

Die Reaktion monoklonaler Antikörper gegen Kern-assoziierte Antigene wurde durch Vergleich des Reaktionsmusters mit Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch an DNA binden, bestimmt. Zur Anwendung kamen zwei Reagenzien:

a) Hoechst 33.258: Fixierte ML-Zellen auf Flow-Multitest-Objektträgern wurden durch 5minütiges Eintauchen in die Farbstofflösung (0,2µg/ml PBS) unmittelbar vor der mikroskopischen Auswertung gefärbt.

b) Propidiumiodid: Die Substanz wurde in einer Konzentration von 2µg/ml dem DABCO-Puffer, der als Fluoreszenzerhaltungspuffer diente (s.3.7.), zugesetzt und so auf fixierten ML-Zellen zur Kernfärbung verwendet.

3.12.2. Reaktionsspektrum monoklonaler Autoantikörper auf verschiedenen Kulturzellen

Um die einzelnen monoklonalen Autoantikörper unterscheiden zu können und um die Verbreitung der von ihnen erkannten antigenen Determinanten näher zu untersuchen, wurde ein Reaktionsspektrum mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf verschiedenen fixierten Kulturzellen aufgenommen (s.Schema 6). Alle Zellen wurden auf Flow-Multitest-Objektträgern ausgesät und 24h später in Aceton/Methanol (1:1) bei -20°C für 10min fixiert. Die Zellen, die

im Test verwendet wurden, stammten von drei verschiedenen Vertebratenklassen:

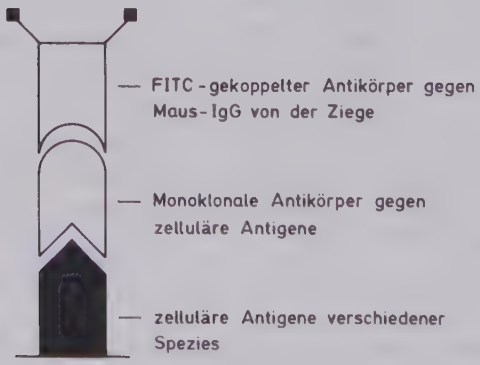
Säuger: - Maus: Schä-T-D-, MCA-, und MEF-Zellen
- Ratte: 208F-, RS1-, NRK- und XC-Zellen
- Nerz: ML-Zellen
- Affe: Vero-Zellen
- Mensch: HF-Zellen
- Rind: MDBK-Zellen

Vögel: - Huhn: CEF-Zellen

Fische: - Forelle: RTG-Zellen
- Lachs: CHSE-Zellen

Die monoklonalen Autoantikörper wurden in Form von unverdünntem Kulturüberstand eingesetzt.

Schema 6: Nachweis der Golgi-Antigene in verschiedenen Kulturzellen



3.13. Charakterisierung der Golgi-Antigene

3.13.1. Radioimmunpräzipitation

Für die Bestimmung des Molekulargewichts der durch Antikörper erkannten Antigene stellt die Radioimmunpräzipitation (RIP) eine sehr empfindliche Methode dar. Antigene werden metabolisch markiert, mit (monoklonalen) Antikörpern und der Hilfe von *Staphylococcus aureus* präzipitiert und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert.

Markierung der Antigene:

Für die RIP wurden verschiedene Zellen metabolisch markiert. Dazu wurden 2 Tage vor der Markierung in Minipetrischalen (ø3cm, Falcon) Kulturen angelegt, die 2, 4, 6 und $8x10^5$ Zellen pro Schale enthielten. Die Markierung erfolgte ausschließlich bei gesunden, dichtgewachsenen Kulturen. Die Zellen von 2 Schalen wurden 2x mit Markierungsmedium (DMEM ohne Methionin und Cystein) +10% FCS, das 500µCi ^{35}S-Methionin und 500µCi ^{35}S-Cystein (Amersham) enthielt, bei 37°C und 5% CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2mal mit kaltem PBS gewaschen, sofort auf Trockeneis (-70°C) schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Immunpräzipitation der Antigene:

Die markierten Zellen wurden mit 1% Triton-A lysiert und die Triton-unlösliche Fraktion durch Ultrazentrifugation abgetrennt (Rotor 50Ti, 39000Upm, 90min, 4°C). Nach Entnahme einer Zählprobe (5µl) zur Überprüfung der Markierung, wurde der Überstand gemäß der Anzahl der zu testenden Antikörper portioniert (ca 60µl/Portion). Nach der Zugabe der Golgi-Antikörper (Ascites-Flüssigkeit 1:10 in PBS, 50µl/Antikörper) wurden die Ansätze 1h bei 37°C und anschließend 1h bei 4°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 70µl einer *Staphylococcus aureus*-Suspension, die zuvor dreimal in 1% Triton (A) gewaschen worden war. Die Ansätze wurden

unter mehrmaligem Schütteln 30min bei 23°C und anschließend 16 bis 18h bei 4°C inkubiert. Nach Sedimentation der Präzipitate durch ein 25%iges Saccharosepolster (Christ-Minifuge, 5000Upm, 10min, 4°C) wurden die Präzipitate in 1% Triton (B) suspendiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 1% Triton (B) und 0,2% Triton (C) (Christ-Biofuge A, 12000Upm, 5min, 23°C) wurden die Präzipitate in je 10µl 0,06% Triton suspendiert. Nach Zugabe von 50µl Probenpuffer wurden die Ansätze 3min auf 95°C erhitzt, um Antigen und Antikörper von den *Staphylococcen* abzutrennen. Die Bakterien wurden sedimentiert (Christ-Biofuge A, 12000Upm, 5min, 23°C), der Überstand abgenommen und, nach Entnahme einer Zählprobe (5µl), bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zählproben wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, in 2ml Szintillationscocktail (Ready-solv, Beckman) gegeben, gut gemischt und für 1min in einem Betacounter gezählt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Die Analyse der durch Golgi-Antikörper präzipitierten Antigene erfolgte auf Gradientengelen, um einen möglichst großen Molekulargewichtsbereich zu erfassen. Das Trenngel bestand aus 2,5 bis 20% Polyacrylamid, 0,0625 bis 0,5% Bisacrylamid und 0,25% SDS in Trenngelpuffer, das Sammelgel aus 2,5% Polyacrylamid in Sammelgelpuffer. Der Lauf wurde mit Kühlung bei 150V gestartet, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte und dann bei 380V bis zum Erreichen des Gelendes weitergeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in H_2O/Methanol/Essigsäure (6:3:1) für 16h fixiert. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel für 2h mit DMSO und für 3h mit PPO-Lösung behandelt. Nach mehrmaligem Waschen in H_2O wurde das Gel getrocknet und einem Röntgenfilm (Konica X-ray film) bei -70°C im Dunkeln exponiert.

Immunpräzipitation mit verschiedenen Zellinien:

Um zu prüfen, ob in Zellen verschiedener Herkunft die gleichen Antigene erkannt und präzipitiert werden, wurden für die Immunpräzipitation mehrere Zellinien markiert. Verwendet wurden dazu Schä-T-D-, RS1- und 208F-Zellen. Schä-T-D-Zellen stammen von zwei verschiedenen Tumorexplantaten. Schä-(TSA^+)-Zellen präsentieren ein Tumoroberflächenantigens (TSA), während Schä-(TSA^-)-Zellen

dieses Oberflächenantigen nicht besitzen (Weiland, persönl. Mitteilung).

Vergleich verschiedener Lysebedingungen:

Neben der Lyse der Zellen durch 1% TritonX-100 in physiologischer Salzkonzentration wurde versucht, mit Hilfe eines hohe Salzkonzentration enthaltenden TritonX-100-Puffers (Extraktionspuffer nach Fey *et al.*, 1984) Golgi-Antigene aus Schä-(TSA^+)-Zellen für die Präzipitation zu isolieren. Denn aus Befunden bei der Immunfluoreszenz war bekannt, daß die Golgi-Antigene nach Behandlung der Zellen mit TritonX-100 in physiologischer Salzkonzentration in der Zelle nachweisbar blieben, nach Behandlung mit Extraktionspuffer jedoch in der Zelle nicht mehr zu erkennen waren.

3.13.2. Immunoblotting

Neben der Immunpräzipitation wurde versucht, die monoklonalen Golgi-Antikörper im Immunoblotting-Verfahren einzusetzen, um vor allem im niedermolekularen Bereich mehr Aufschlüsse über die Golgi-Antigene zu erhalten, nachdem sich die Identifizierung solcher Antigene in der Immunpräzipitation bei der Verwendung von Gradientengelen als schwierig erweist. Außerdem sollte durch den Einsatz monoklonaler Antikörper (gegen LDV_{AGIA} und gegen Golgi-Antigene) im Immunoblotting untersucht werden, ob eine Kreuzantigenität zwischen Golgi- und Virusantigenen besteht.

Kultivierung und Lyse der Zellen:

Schä-T-D-Zellen wurden in einer Konzentration von 3 bis $4x10^5$/ml in Minipetrischalen ausgesät und 48h bei 37°C und 5% CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand entfernt und die Zellen 2mal kurz mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch Behandlung der Zellen mit Probenpuffer (1ml/Mini). Unlösliches Material wurde sedimentiert (Christ-Minifuge, 4000Upm,10min, 4°C) und der Überstand für die gelelektrophoretische Auftrennung eingesetzt.

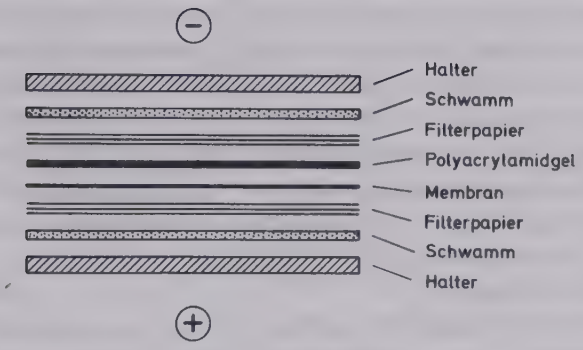
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Die Zellysate wurden auf 2,5 bis 20% SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen bei 380V elektrophoretisch aufgetrennt (Sammelgele: 2,5%), um einen möglichst großen Molekulargewichtsbereich bei der Analyse zu erfassen. Nach dem Lauf wurden die Gele für 30min in Blotting-Puffer-2 äquilibriert.

Blotting:

Die aufgetrennten zellulären Proteine wurden in einer BioRad-Blotting-Apparatur auf Immobilon-Membranen übertragen. Membranstreifen wurden zur Aktivierung ihrer Oberflächenladungen kurz in Methanol getaucht, 5min in H_2O bidest und 15min in Blotting-Puffer gewaschen. Der Transfer der Proteine erfolgte unter Kühlung in zwei Schritten: 1) für 1h bei 400mA und 2) für 16-18h bei 1000-1500mA. Freie Bindungsstellen auf den Streifen wurden durch Inkubation in Blockierungspuffer für 1h bei 23°C abgesättigt, Streifen mit den aufgetrennten Markerproteinen wurden parallel dazu mit Amidoschwarzlösung angefärbt und getrocknet. Nach dem Blockierungsschritt und dem Waschen der Membranstreifen in PBS-Tween, PBS-NaCl und PBS-Tween (30min, 5min, 30min) bei 23°C erfolgte die Inkubation mit den spezifischen Antikörpern, die in PBS 1:1000 (Serum) oder 1:500 (Ascites) verdünnt vorlagen, für 16h bei 4°C unter ständigem Schütteln. Nach erneutem Waschen in PBS-Tween, PBS-NaCl und PBS-Tween (30min, 5min, 30min) wurden die Streifen mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziegenantikörper gegen Maus-IgG (BioRad, 1:3000 in PBS) für 90min bei 23°C behandelt. Auf einen weiteren Waschschritt in PBS-Tween für 30min folgte die Zugabe der Substratlösung mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol, in der die Streifen bis zur Färbung im Dunkeln bei 23°C inkubiert wurden (10-15min). Die Reaktion wurde mit 5% Essigsäure gestoppt, die Streifen kurz gewässert und zwischen Filterpapier getrocknet.

Schema 8: Übertragung der Antigene vom Gel auf Membranen



3.13.3. Immunelektronenmikroskopie

Da der Golgi-Apparat distinkte Kompartimente (trans, medial, cis) mit unterschiedlicher Enzymausstattung besitzt (Goldfischer, 1982, Dunphy & Rothman, 1985), war elektronenmikroskopisch zu prüfen, ob die monoklonalen Golgi-Antikörper im Vergleich zum polyklonalen Antiserum den ganzen Golgi-Apparat oder nur Teile davon erkennen. Da Bedingungen bei der Fixierung und Markierung der Zellen, die eine optimale Erhaltung der Feinstruktur gewährleisten, nicht immer die Antigenität befriedigend erhalten, wurden die Zellen in Anlehnung an die Methode von Dunphy *et al.*, (1985) behandelt. Anschließend erfolgte *in situ*-Einbettung in Araldit.

Kultivierung und Fixierung der Zellen:

Die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt an XC-Zellen, deren Golgi-Apparat in Immunfluoreszenzstudien besonders kompakt erscheint (Weiland *et al.*, 1984) und bei NRK-Zellen, die von mehreren Autoren für ähnliche Untersuchungen verwendet worden waren (Burke *et al.*, 1982; Louvard *et al.*, 1982;

Yuan *et al.*, 1987).

In Vorstudien mußte zunächst geklärt werden, ob die nach Dunphy *et al.* (1985) vorgeschriebenen Bedingungen der Zellfixierung (mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd) und der Membranpermeabilisierung (durch Saponin) vor der Antikörperapplikation noch den Nachweis von Golgi-Antigenen durch LDV_{AGIA}-induzierte Antikörper erlauben. Voraussetzung für die elektronenmikroskopische Darstellung der markierten Strukturen ist die Anlagerung von Osmiumtetroxid an das Reaktionsprodukt des zum Nachweis der Peroxidasereaktion verwendeten Substrates 3,3'-Diaminobenzidin. In den lichtmikroskopischen Vorversuchen wurde wegen seiner geringeren Canzerogenität als Peroxidase-Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazol eingesetzt.

Im Hauptversuch wurden die Zellen in einer Konzentration von $1x10^5$ Zellen/ml auf Flow-Multitest-Objektträger ausgesät (50µl/Feld) und 24h bei 37°C und 5% CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden kurz mit PBS bei 23°C gespült und 30min in 2% Paraformaldehyd+0,01% Glutaraldehyd in PBS bei 4°C fixiert, gefolgt von einem 30minütigen Waschen in 50mM NH_4CL in PBS bei 23°C. Um die Membran der Zellen für Antikörper durchlässig zu machen, wurden die Zellen 30min in Saponin-haltigem Puffer M bei 23°C inkubiert.

Markierung:

Die so vorbehandelten Zellen wurden für 16h mit den Golgi-spezifischen Antikörpern bei 23°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörper lagen in Form von Kulturüberstand oder Ascites-Flüssigkeit vor und wurden verschieden stark in Puffer M verdünnt (Kulturüberstand: 1:5 und 1:10, Ascites: 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000). Nach drei Waschschritten à 5min in Puffer M wurden die Zellen mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziegenantikörper gegen Maus-IgG (Dianova), der 1:500 oder 1:1000 in Puffer M verdünnt vorlag, 90min bei 23°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x5min in Puffer M bei 23°C und 3x5min in PBS bei 4°C gewaschen. Der besseren Erhaltung der Strukturen diente eine Nachfixierung für 30min mit 1,5% Glutaraldehyd in 0,05M Cacodylatpuffer bei 4°C. Nach dem Waschen in Tris-HCl-Puffer pH7,6 bei 4°C 3x5min wurde als Substrat 0,1% Diaminobenzidin+10mM

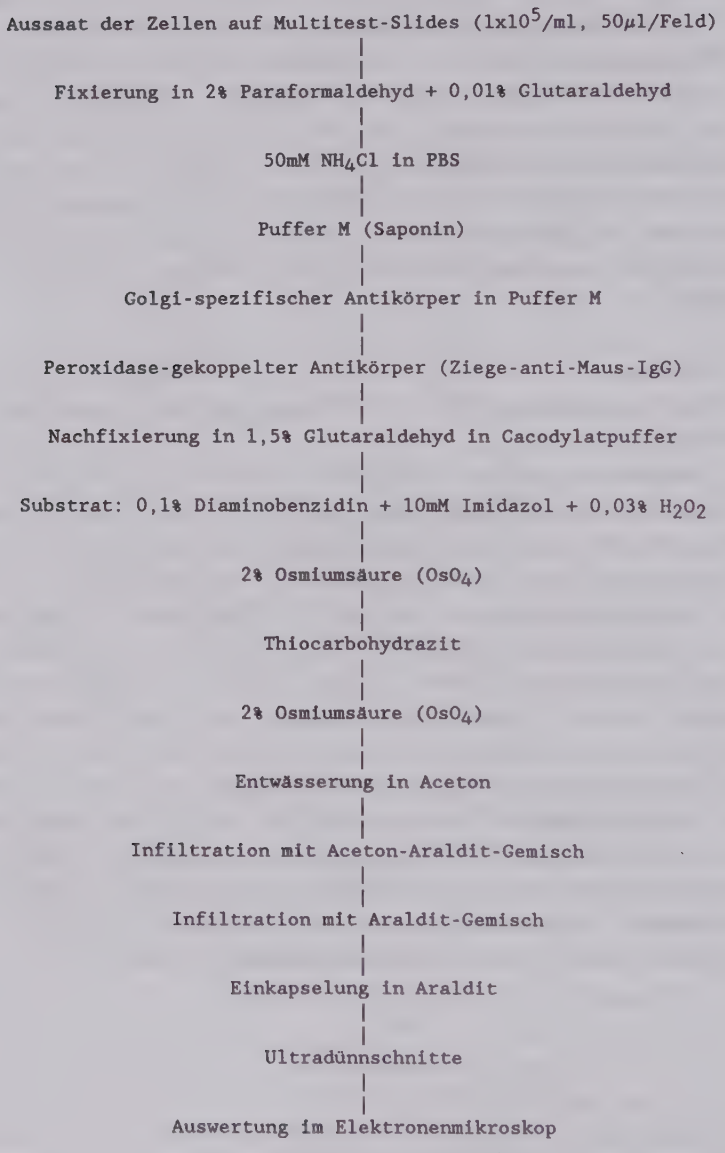
Imidazol +0,03% H_2O_2 in Tris-HCl-Puffer zugegeben (Straus, 1982) und 1h bei 23°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde erneut 3x5min in Tris-HCl-Puffer bei 4°C gewaschen und die Reaktion unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nachbehandelt wurden die Zellen für 15min mit 2% Osmiumsäure bei 4°C; dann wurden sie 4x3min mit Aqua dest. bei 23°C gewaschen, 5min bei 23°C mit einer gesättigten Thiocarbohydrazit-Lösung inkubiert, erneut 4x3min mit Aqua dest. gewaschen und anschließend ein zweites Mal mit 2% Osmiumsäure für 15min bei 4°C behandelt (OTO-Methode nach Seligman et al., 1966). Zum Schluß wurden die Zellen 3x15min in Aqua dest. bei 4°C gewaschen.

Einbettung:

Zuerst erfolgte schrittweise Entwässerung der Proben durch Aceton.

Anschließend erfolgte Infiltration der Zellen mit Araldit: Zuerst mit einem Aceton-Araldit-Gemisch im Verhältnis 3+1 für 30min bei 23°C, 1+1 für 45min bei 23°C und 1+3 für 60min bei 23°C, dann mit dem Araldit-Gemisch allein für 60min bei 23°C, für 18h bei 23°C und nochmals für 60min bei 23°C. Schließlich wurden die Zellen eingekapselt. Dazu wurde auf jedes Feld des Objektträgers eine Gelatinekapsel gesetzt, deren rundes Ende abgeschnitten worden war.Nach Zugabe eines Tropfens des Araldit-Gemisches erfolgte Vorinkubation für 16h bei 23°C und nach Auffüllen des Gelatineröhrchens mit dem Epoxidharz Inkubation für 16h bei 60°C bis zur vollständigen Polymerisation. Die fertigen Blöcke wurden vom Objektträger abgelöst und getrimmt. Mit einem Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte hergestellt und auf befilmte Netzchen aufgebracht. Anschließend konnten die Schnitte im Elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert werden (s.Schema 7).

Schema 7: Immunelektronenmikroskopie (nach Dunphy *et al.*, 1985)



3.14. Produktion monoklonaler Antikörper gegen Virusantigene

Neben der Produktion von monoklonalen Autoantikörpern gegen zelluläre Antigene wurde in denselben Fusionen auch versucht, Hybridome zu etablieren, die Antikörper gegen virales Antigen sezernieren. Dazu wurden die Kulturüberstände der Hybridomkulturen etwa 10 bis 14 Tage nach der Fusion in der indirekten Immunfluoreszenz auf Aceton/Methanol-fixierten, infizierten Makrophagen getestet. Kulturen, die Antikörper gegen Virusantigene produzierten, wurden in der bereits beschriebenen Weise (s.3.11.) sofort durch Endpunktverdünnung kloniert. Positive Klone wurden subkloniert, um Klonalität sicherzustellen und um die Stabilität der Klone zu prüfen. Aliquots der Ausgangshybridome, der Klone und der Subklone wurden in RPMI+15% FCS +10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert. Um große Mengen an Antikörpern zu erhalten, wurde in Pristan-behandelten Mäusen (F_1-Mäuse von STU und Balb/c) Ascites-Flüssigkeit produziert (s.3.11.).

3.15. Charakterisierung der Virusantigene

3.15.1. Radioimmunpräzipitation

Gewinnung und Kultur der Makrophagen:

Balb/c-Mäusen wurden je 1ml Peptonlösung intraperitoneal injiziert. Drei Tage später wurden die Mäuse getötet und der Bauchraum mit 0,34M Saccharose in Saline ausgespült. Die Zellen wurden sedimentiert (Christ-Minifuge, 1500Upm, 10min, 4°C), in einer Konzentration von $6x10^6$ Makrophagen/ml in RPMI+15% FCS suspendiert und in Minipetrischalen bei 37°C und 5% CO_2 für 10h kultiviert.

Markierung:

Die Makrophagenkulturen wurden 2mal mit Markierungsmedium (DMEM ohne Methionin und Cystein) gewaschen und 30min mit Markierungsmedium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Hälfte der Zellen mit LDV_{AGIA} ($10^9 ID_{50}$/ml) in Markierungsmedium +10% FCS +250µCi ^{35}S-Methionin +250µCi ^{35}S-

Cystein beimpft. Die andere Hälfte erhielt dasselbe Medium mit den radioaktiven Aminosäuren, aber ohne Virus. Beide Ansätze wurden für 12h bei 37°C ond 5% CO_2 in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Kulturüberstände wurden abgenommen, freie Viruspartikel sedimentiert (Rotor SW41, 35000Upm, 60min, 4°C) und in TEN-Puffer suspendiert. Die Makrophagen wurden 2mal mit PBS gewaschen und mit 1% Triton (A) lysiert. Triton-unlösliches Material wurde entfernt (Rotor 50Ti, 39000Upm, 90min, 4°C) und der Überstand für die Präzipitation mit den monoklonalen Virusantikörpern eingesetzt.

Immunpräzipitation der Virusantigene:

Zellysate und Viruspräparationen aus dem Kulturüberstand wurden in der beschriebenen Art (s.3.13.) in der Immunpräzipitation mit monoklonalen Virusantikörpern und *Staphylococcus* eingesetzt. Nach Abtrennung der Bakterien durch 3minütiges Kochen in Probenpuffer und anschließender Sedimentation (Christ-Biofuge A, 12000Upm, 5min, 23°C) wurden die Überstände auf ein 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Sammelgel: 4%) und elektrophoretisch bei 380V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele wie beschrieben (s.3.13.) weiterbehandelt, getrocknet und autoradiographiert.

3.15.2. Immunoblotting

Um die Spezifität der monoklonalen Virusantikörper parallel zur Immunpräzipitation zu bestimmen, wurden verschiedene Viruspräparationen für ein Immunoblotting eingesetzt.

1) LDV_{AGIA} aus dem Lysat infizierter Makrophagen

2) LDV_{AGIA} aus dem Serum infizierter Tiere, über einen Saccharosegradienten gereinigt, pelletiert und in TEN-Puffer suspendiert

3) LDV_{AGIA} aus dem Serum infizierter Tiere, virushaltige Fraktion des Saccharosegradienten

4) LDV_{AGIA} aus Serum infizierter Tiere, unfraktioniert

ad 1)

Peritonealmakrophagen von Pepton-stimulierten Balb/c-Mäusen (s.3.15.1.) wurden in RPMI+15% FCS in einer Konzentration von $6x10^6$ Zellen/ml in Minipetrischalen ausgesät und 10h bei 37°C und

5% CO_2 inkubiert. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit LDV_{AGIA} infiziert (10^9 ID_{50}/ml), bei der anderen Hälfte erfolgte nur ein Mediumwechsel. Nach einer Inkubation von 12h bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen 2mal kurz mit TEN-Puffer gewaschen und mit Probenpuffer lysiert (1ml/Schale). Die Lysate waren nach 3minütigem Aufkochen für die elektrophoretische Auftrennung vorbereitet.

ad 2)

Virushaltiges Serum, das 72h nach Infektion von STU-Mäusen gewonnen worden war, wurde zunächst niedertourig geklärt (Christ-Minifuge, 5000Upm, 30min, 4°C). Das Virus wurde pelletiert (Rotor SW41, 35000Upm, 120min, 4°C), in TEN-Puffer suspendiert und auf einen linearen Saccharosegradienten (10-50% Saccharose in TEN-Puffer) aufgetragen. Nach der Zentrifugation (Rotor SW41, 35000Upm, 20h, 4°C) wurde der Gradient fraktioniert, der Refraktionsindex der einzelnen Fraktionen zur Bestimuung der Dichte ermittelt und die virushaltigen Fraktionen vereinigt. Das Virus wurde erneut sedimentiert (Rotor SW55, 45000Upm, 50min, 4°C), in TEN-Puffer suspendiert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Für die elektrophoretische Analyse wurde das Virusmaterial 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 3min bei 95°C inkubiert.

ad 3)

Virushaltiges Serum, das 49h nach Infektion von STU-Mäusen gewonnen worden war, wurde direkt auf einen linearen Saccharosegradienten (10-50%) aufgeschichtet. Nach der Zentrifugation (Rotor SW41, 35000Upm, 20h, 4°C) wurden die virushaltigen Fraktionen 1:1 mit Probenpuffer gemischt, 3min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen.

ad 4)

Dasselbe virushaltige Serum aus dem 49h-pool wurde unfraktioniert 1:50 in PBS verdünnt, 1:1 mit Probenpuffer gemischt, 3min bei 95°C inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Alle Viruspräparationen wurden auf linearen 15% SDS-Polyacrylamid-Trenngelen (Sammelgele: 4%) bei 380V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele zur Entfernung von SDS 30min in Renaturierungspuffer gewaschen und 30min in Blotting-

Puffer äquilibriert.

Blotting:

Die aufgetrennten Proteine wurden in einer BioRad-Blotting-Apparatur auf Nitrozellulose- (BioRad) oder auf Immobilon-Membranen (Millipore) übertragen (s.Schema 8).

Die Durchführung des Proteintransfers auf die Membranen folgte dem in 3.13.2.beschriebenen Verfahren, mit einigen Abweichungen:
1) Es wurde der Blottingpuffer-1 verwendet (s.2.3.) und
2) Der Transfer erfolgte bei 180-200mA für 16h, da das Hauptinteresse auf der Übertragung der Virusproteine lag, die sich, mit einem erwarteten Molekulargewicht <50kD, auch bei geringeren Stromstärken übertragen lassen.

4. Ergebnisse

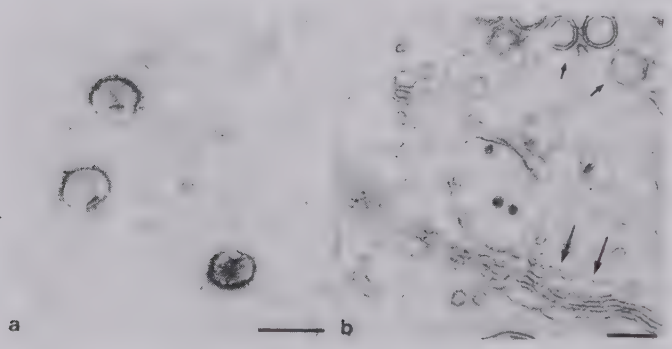
4.1. Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA}

Wie inzwischen gezeigt werden konnte (Weiland *et al.*, 1987), besitzt der zunächst nicht identifizierte und vorläufig als AGIA (anti-Golgi inducing agent) bezeichnete autoantikörperinduzierende Erreger alle Eigenschaften, die etablierte LDV-Isolate kennzeichnen. Abb.1 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von LDV_{AGIA}: durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und negativ gefärbt (a) bzw. im Ultradünnschnitt eines infizierten Makrophagen (b). Die negativ gefärbten Partikeln wiesen eine sphärische Gestalt auf und zeigten die für nonarbo-Togaviren charakteristische Morphologie. Im Ultradünnschnitt durch einen infizierten Makrophagen waren sphärische Partikeln erkennbar in cytoplasmatischen Vesikeln, die sich zum Teil in unmittelbarer Nähe des Golgi-Apparates befinden. Auffällig waren in den infizierten Makrophagen Doppelmembranvesikel, die in normalen Makrophagen nicht zu beobachtet waren.

Der zunächst nur durch einen Bioassay, basierend auf der Induktion von zwei Autoantikörpergruppen, nachweisbare Erreger konnte auch über Bestimmung der LDH-Aktivität im Serum, die nach Infektion mit bekannten LDV-Stämmen drastisch erhöht ist, nachgewiesen werden (Tab.1). Beide Verfahren zeigten volle Übereinstimmung. Nur die Proben hatten erhöhte LDH-Werte, in denen Autoantikörper zu beobachten waren und umgekehrt. Allerdings konnten hämolytische Seren nicht für LDH-Bestimmungen eingesetzt werden, während der Autoantikörpernachweis in solchen Proben nicht beeinträchtigt war.

Über den Ort der Virusreplikation *in vivo* war bekannt, daß eine Subpopulation von Makrophagen (Ia-positive Makrophagen) die einzigen für LDV permissiven Zellen sind (Inada & Mims, 1984).

Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von LDV_{AGIA}



Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ gefärbten LDV-Partikeln: (a) aus einer durch Dichtegradienten gereinigten Virussuspension (Balken entspricht 100nm) und (b) im Ultradünnschnitt eines Makrophagen, 12h nach der Infektion (Balken entspricht 200nm). Große Pfeile: Golgi-Zisternen; kleine Pfeile: Doppelmembran-Vesikel.

Tab.1: Nachweis der LDV_{AGIA}-Infektion im Bioassay und durch LDH-Bestimmung im Serum

Virus-Verdünnung[1]	Maus-nr.	anti-TSA-Antikörper[2]	anti-Golgi-Antikörper[3]	LDH-Aktivität[4] (U/l)
10^{-7}	1	+	+	1181
	2	+	+	1249
	3	+	+	1181
10^{-8}	1	+	+	1485
	2	+	+	1451
	3	+	+	1215
10^{-9}	1	-	-	202
	2	-	-	303
	3	+	+	1215
	4	-	-	236

1) LDV-haltiges Serum wurde in PBS+10% FCS verdünnt und in STU-Mäuse intramuskulär injiziert (100µl/Maus)

2) Antikörper gegen ein Oberflächenantigen von Tumorzellen (Sac-Zellen) wurden in einem Komplement-abhängigen, Antikörper-vermittelten Chrom-Freisetzungstest bestimmt

3) Antikörper gegen Golgi-Antigen wurden in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Schä-T-D-Zellen bestimmt

4) Die Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH) wurde mit einem Testkit (Sigma LD-L Reagenz) photometrisch bestimmt

4.2. Infektion von Makrophagen mit LDV_{AGIA} *in vivo*

Um den Verlauf der Infektion in Peritonealmakrophagen nach LDV-Inokulation *in vivo* zu untersuchen und um für das Screening auf Virusantikörper ein Maximum infizierter Zellen zu erhalten, wurden STU-Mäuse auf unterschiedliche Art infiziert und die Makrophagen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion isoliert (Tab.2). Während in fixierten Makrophagenkulturen, die 6 und 12 Stunden nach der Infektion gewonnen wurden, keine infizierten Zellen nachweisbar waren, konnten 18 Stunden nach intraperitonealer Inokulation zahlreiche LDV-infizierte Makrophagen beobachtet werden. Auch nach 24 Stunden waren noch einige infizierte Zellen pro Feld nachweisbar, während 72 Stunden nach der Infektion keine fluoreszierenden Zellen mehr zu beobachten waren. Die Reaktion nach intramuskulärer Infektion war etwas verzögert, hier war ein Maximum infizierter Makrophagen 24 Stunden nach der Infektion feststellbar. Störend bei allen *in vivo*-Infektionen wirkte sich allerdings aus, daß die fixierten Kulturen viele schwach fluoreszierenden B-Zellen enthielten, die die Auswertung der Ansätze erschwerte.

Tab.2: Nachweis virusinfizierter Peritonealmakrophagen nach Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA}

Stunden p.i.[1]	Infektionserfolg[2]	
	i.m.[3]	i.p.[4]
6	-	-
12	-	-
18	+[5]	+++
24	++	++
72	-	-

1) Makrophagen wurden nach der angegebenen Zeit aus dem Bauchraum infizierter STU-Mäuse gewonnen, auf Flow-Multitest-Objektträger ausgesät und 5h später in Aceton/Methanol fixiert

2) Die Zahl der infizierten Makrophagen wurde nach der Reaktion mit einem virusantikörper-haltigen Serumpool in der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt

3) i.m.: LDV intramuskulär injiziert ($10^5 ID_{50}$/Maus)

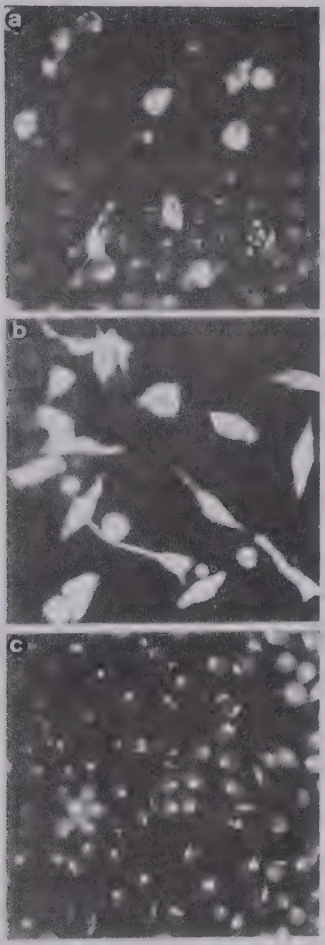
4) i.p.: LDV intraperitoneal injiziert ($10^5 ID_{50}$/Maus)

5) Infektionserfolg: + : ca. 15 Zellen/Feld infiziert
++ : ca. 50 Zellen/Feld infiziert
+++ : ca. 100 Zellen/Feld infiziert

4.3. Infektion von Makrophagen mit LDV_{AGIA} *in vitro*

Bei den Versuchen, Peritonealmakrophagen *in vitro* zu infizieren, erwiesen sich Makrophagen von Balb/c-Mäusen, die vier Tage vor der Zellgewinnung mit Pepton intraperitoneal stimuliert worden waren, am geeignetsten. Zwar gelang auch die Infektion von STU-Makrophagen, aber die Anzahl der infizierten Zellen und deren Brillianz in der Fluoreszenz blieb hinter der von Balb/c-Makrophagen zurück. Infektionen verliefen erfolgreich sowohl am Tage der Zellgewinnung als auch 24 bis 48h nach Aussaat der Zellen. Der Nachweis der Infektion war nach Fixation der Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz mit Seren infizierter Tiere oder später mit monoklonalen Virusantikörpern möglich. Selbst bei der Anwendung sehr hoher Erregerkonzentrationen (50 bis 100 infektiöse Einheiten pro Zelle) wurden maximal 10% der Zellen infiziert (Abb.2a und b). Das war dann der Fall, wenn die Fixierung 10 bis 12h nach der Infektion erfolgte. Bereits 17h nach der Infektion war die Anzahl stark fluoreszierender Zellen deutlich reduziert und 49h nach der Infektion konnten nur noch sporadisch infizierte Zellen festgestellt werden.

Abb.2: Reaktion von Serumantikörpern auf infizierten und nicht-infizierten Makrophagenkulturen



Serumantikörper auf nicht infizierten (c) bzw. auf infizierten Makrophagenkulturen (a und b)
a: anti-Golgi-Antikörperpool mit hohem Golgi-Antikörpertiter und geringem Virusantikörpertiter
b: anti-LDV-Antikörperpool mit hohem Virusantikörpertiter und geringem Golgi-Antikörpertiter
c: anti-Golgi-Antikörperpool

4.4. Bestimmung der IgM- und IgG-Konzentration im Serum vor und nach Infektion

Für das Laktatdehydrogenase-Virus ist eine polyklonale Stimulierung des Immunsystems beschrieben, die mit einer drastischen Erhöhung der Immunglobulinkonzentration im Serum einhergeht (Notkins *et al.*,1966). Es war zu prüfen, ob Infektion mit dem hier untersuchten Isolat LDV_{AGIA} ebenfalls einen Anstieg der Immunglobulinkonzentration induziert.

Wie die Bestimmung durch die radiale Immundiffusion ergab, führte die Infektion mit LDV_{AGIA} bei allen Mäusen zu einem deutlichen Anstieg der IgG-Konzentration 14 Tage nach der Infektion. Auch nach 61 Tagen lagen die Werte unverändert hoch, zum Teil konnte noch eine weitere leichte Zunahme beobachtet werden (Tab.3). Ähnlich verhielten sich die Werte bei der IgM-Konzentration im Serum. Auch hier konnte ein deutlicher Anstieg nach 14 und nach 61 Tagen festgestellt (Tab.4) werden. Darüberhinaus war zu beobachten, daß die IgG-Konzentrationen um den Faktor 50 über den IgM-Konzentrationen lagen.

Tab.3: Quantitative IgG-Bestimmung im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

Maus-nr.	Infektionsdosis[1] (ID_{50}/ml)	IgG-Konzentration (mg/ml)[2] 0d p.i.[3]	14d p.i.	61d p.i.
1	10^6	3500	9600	9800
2	10^6	2800	9800	n.t.
3	10^6	5650	11250	11900
4	10^6	1200	10100	12200

1) Serum, das 2 Tage nach der Infektion von STU-Mäusen gewonnen worden war, wurde in PBS+10% FCS verdünnt und in STU-Mäuse intramuskulär injiziert (100µl/Maus)

2) Die IgG-Konzentration wurde mit Hilfe eines Testkits (Miles) durch radiale Immundiffusion bestimmt. Als Referenz dienten 3 IgG-Standards mit bekannter Konzentration

3) d p.i.: Tag der Bestimmung nach der Infektion

Tab.4: Quantitative IgM-Bestimmung im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

Maus-nr.	Infektionsdosis[1] (ID_{50}/ml)	IgM-Konzentration (mg/ml)[2]		
		0d p.i.[3]	14d p.i.	61d p.i.
1	10^6	80	235	215
2	10^6	50	205	n.t.
3	10^6	140	275	225
4	10^6	60	235	215

1) Serum, das 2 Tage nach der Infektion von STU-Mäusen gewonnen worden war, wurde in PBS+10% FCS verdünnt und STU-Mäusen intramuskulär injiziert (100µl/Maus)

2) Die IgM-Konzentration wurde mit Hilfe eines Testkits (Miles) durch radiale Immundiffusion bestimmt. Als Referenz dienten 3 IgM-Standards mit bekannter Konzentration.

3) d p.i.: Tag der Bestimmung nach der Infektion

4.5. Titerbestimmung von Autoantikörpern gegen zelluläre Antigene im Serum infizierter Mäuse

Autoantikörper gegen Golgi-Antigene:

In einer ersten Untersuchung wurde geklärt, ob eine erfolgreiche Infektion mit LDV_{AGIA} immer in der Lage ist, die Bildung von anti-Golgi Autoantikörpern zu induzieren und zu welchem Zeitpunkt diese Antikörpergruppe nach der Infektion im Serum zu beobachten ist in Abhängigkeit von der applizierten Virusdosis. Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, erfolgt die Antikörperinduktion in allen erfolgreich infizierten Tieren. Der Nachweis der Golgi-Antikörper gelang 6 Tage nach der Infektion mit hohen Virusdosen und 7 Tage nach der Infektion mit niedrigen Dosen.

Um den Verlauf der Autoimmunantwort gegen Antigene des Golgi-Apparates nach LDV_{AGIA}-Infektion genauer zu analysieren und um einen günstigen Zeitpunkt für die Milzentnahme zur Produktion monoklonaler Antikörper zu finden, wurden Seren von STU-Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion gewonnen und in der indirekten Immunfluoreszenz der Titer der anti-Golgi-Autoantikörper bestimmt. Zur Untersuchung kamen zwei verschiedene Serumserien: eine Gruppe von Mäusen war mit virushaltigem Serum, das etwa $10^{11} ID_{50}$/ml enthielt, infiziert worden (Gruppe 1), eine zweite Gruppe mit einer Virussuspension mit etwa $10^{7} ID_{50}$/ml (Gruppe 2). Wie die Tabellen zeigen (Tab.6a und b), wurde bei allen infizierten Tieren, unabhängig von der Virusdosis, die Bildung von Golgi-Antikörpern induziert. In beiden Gruppen lag das Titermaximum (2400) für diese Antikörper 14 bis 28 Tage nach der Infektion. Danach reagierten die Tiere individuell unterschiedlich: Nach einem Absinken des Golgi-Antikörpertiters oder einem völligen Verschwinden der Antikörper etwa 50 Tage nach der Infektion, stiegen die Titerwerte bei einigen Tieren zu einem späteren Zeitpunkt (96-192 Tage p.i.) wieder an.

Tab.5: Induktion von anti-Golgi-Autoantikörpern in STU-Mäusen nach Infektion mit LDV_{AGIA}

Virusdosis[1] (ID_{50}/Maus)	Anzahl der behandelten Mäuse	LDV im Serum[2]	Anzahl anti-Golgi Antikörper produz. Mäuse[3] Tage p.i.						
			0	5	6	7	9	12	16
$10^{7,5}$	5	5/5	0	0	e[4]	5	5	5	5
$10^{5,5}$	5	5/5	0	0	e	5	5	5	5
$10^{3,5}$	5	5/5	0	0	e	5	5	5	5
$10^{1,5}$	5	5/5	0	0	n.s.e.[5]	5	5	5	5
$10^{0,5}$	5	5/5	0	0	n.s.e.	5	5	5	5
$10^{0,05}$	5	0/5	0	0	0	0	0	0	0

1) Die angegebene Virusdosis wurde, in PBS+10% FCS verdünnt, den Mäusen intramuskulär injiziert (100µl/Maus)

2) Der Virusnachweis wurde durch einen Bioassay (s.3.3.) geführt

3) Der Nachweis von anti-Golgi-Antikörpern im Serum der Mäuse wurde in der indirekten Immunfluoreszenz an fixierten Schä-T-D-Zellen geführt (Serumverdünnungen: 1:150 in PBS+2% Kaninchenserum)

4) Reaktion mit Golgi-Antigen zum Teil schwach erkennbar

5) Reaktion mit Golgi-Antigen nicht sicher erkennbar

Tab.6a: Titer der anti-Golgi-Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse (Gruppe 1)

Maus	Infektionsdosis[1] (ID_{50})	anti-Golgi-Antikörpertiter[2] 14d p.i.	28d p.i.	42d p.i.	56d p.i.	131d p.i.
1	10^4	2400	1200	0	0	300
2	10^4	2400	2400	600	300	600
3	10^3	2400	1200	600	1200	600
4	10^3	2400	600	300	0	600
5	10^3	2400	1200	1200	1200	600
6	10^2	2400	2400	0	300	300
7	10^2	1200	1200	0	0	0
8	10^2	2400	2400	1200	150	0
9	10	2400	1200	600	600	300
10	10	2400	2400	600	150	300

1) STU-Mäuse wurden mit einem virushaltigen Serumpool intramuskulär infiziert (100µl/Maus), Serumverdünnungen in PBS+10% FCS

2) Der Titer der Golgi-Antikörper wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz in einer Verdünnungsreihe auf murinen Schä-T-D-Zellen bestimmt

Tab.6b: Titer der anti-Golgi-Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse (Gruppe 2)

Maus	Infektionsdosis[1] (ID_{50})	anti-Golgi-Antikörpertiter[2] 14d p.i.	26d p.i.	61d p.i.	96d p.i.	192d p.i.
1	10^4	2400	2400	300	1200	0
2	10^4	2400	2400	300	300	1200
3	10^4	2400	2400	0	150	300
4	10^4	2400	1200	1200	1200	1200
5	10^4	2400	2400	0	0	0
6	10^3	2400	2400	0	300	600
7	10^3	2400	2400	300	300	300
8	10^3	2400	2400	600	1200	150
9	10^3	2400	2400	600	300	1200
10	10^3	2400	2400	600	0	600
11	10^2	2400	2400	600	0	1200
12	10^2	2400	2400	n.t.	1200	600
13	10^2	2400	2400	0	600	1200
14	10^2	2400	2400	n.t.	600	0
15	10^2	2400	2400	600	0	0
16	10	2400	1200	600	0	o
17	10	2400	2400	600	n.t.	n.t.
18	10	2400	2400	0	300	1200
19	10	300	2400	0	n.t.	n.t.
20	1	2400	2400	0	0	0

1) STU-Mäuse wurden mit einem virushaltigen Serumpool intramuskulär infiziert (100µl/Maus), Serumverdünnungen in PBS+10% FCS

2) Der Titer der Golgi-Antikörper wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz in einer Verdünnungsreihe auf Schä-T-D-Zellen bestimmt

Autoantikörper gegen weitere zelluläre Antigene:

Bei der Verwendung von ML als Targetzellen in der indirekten Immunfluoreszenz war es möglich, neben den Golgi-Antikörpern auch Antikörperreaktionen gegen gegen weitere zelluläre Antigene deutlich zu erkennen. Vor allem in Seren, die etwa ab der vierten Woche nach der Infektion gewonnen worden waren, zeigten sich häufig Reaktionen mit Anteilen des Zytoskeletts, die, nach Behandlung der ML-Zellen mit Colcemid, meist als Intermediärfilamente identifiziert werden konnten. Daneben wurden auf diesen Targetzellen auch Reaktionen mit Mitochondrien- und Kern-assoziierten Antigenen beobachtet. Bei der Verwendung von Schä-T-D als Targetzelle, die für den Nachweis von Golgi-Antikörpern eingesetzt worden war und deren Zytoskelett offensichtlich weniger deutlich ausgeprägt ist, wurden solche Reaktionen wesentlich seltener beobachtet und sind deshalb bisher nicht beschrieben.

Bei der Titerbestimmung der Zytoskelett-Antikörper in den beiden beschriebenen Serumserien zeigte sich kein eindeutiges Maximum (Tab.7a und b). Die Tiere reagierten individuell sehr unterschiedlich. Die im Durchschnitt höchsten Antikörpertiter waren 42 bzw. 61 Tage nach der Infektion nachzuweisen. Andere Autoantikörper gegen zelluläre Strukturen, wie gegen Kern- oder Mitochondrien-assoziierte Antigene, traten nur sporadisch im Serum infizierter Tiere auf und zeigten keine Beziehung zum Verlauf der Infektion.

Tab.7a: Titer der anti-Zytoskelett-Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse (Gruppe 1)

Maus	Infektionsdosis[1] (ID_{50})	anti-Zytoskelett-Antikörpertiter[2]				
		14d p.i.	28d p.i.	42d p.i.	56d p.i.	131d p.i.
1	10^4	2400	600	150	300	0
2	10^4	300	600	150	300	600
3	10^3	0	600	2400	2400	2400
4	10^3	2400	2400	2400	2400	2400
5	10^3	600	300	1200	600	300
6	10^2	0	600	1200	0	300
7	10^2	0	300	600	300	150
8	10^2	300	0	150	150	300
9	10	0	600	1200	0	0
10	10	2400	150	150	0	0

1) STU-Mäuse wurden mit einem LDV-haltigen Serumpool intramuskulär infiziert (100µl/Maus), Serumverdünnungen in PBS+10% FCS

2) Der Titer der Zytoskelett-Antikörper wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz in einer Verdünnungsreihe auf ML-Zellen bestimmt

Tab.7b: Titer der anti-Zytoskelett-Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse (Gruppe 2)

Maus	Infektionsdosis[1] (ID_{50})	anti-Zytoskelett-Antikörpertiter[2] 14d p.i.	26d p.i.	61d p.i.	96d p.i.	192d p.i.
1	10^4	300	600	600	600	0
2	10^4	150	2400	1200	600	0
3	10^4	300	600	2400	1200	150
4	10^4	150	600	2400	600	300
5	10^4	150	2400	2400	2400	2400
6	10^3	0	300	150	0	0
7	10^3	0	300	600	150	0
8	10^3	300	300	2400	0	0
9	10^3	0	600	1200	0	300
10	10^3	300	600	600	300	150
11	10^2	600	1200	150	0	0
12	10^2	0	300	n.t.	600	300
13	10^2	1200	1200	300	2400	1200
14	10^2	600	2400	n.t.	600	0
15	10^2	2400	2400	1200	2400	1200
16	10	300	1200	300	150	300
17	10	150	300	1200	n.t.	n.t.
18	10	0	150	0	0	300
19	10	600	600	0	n.t.	n.t.
20	1	0	150	300	300	150

1) STU-Mäuse wurden mit einem virushaltigen Serumpool intramuskulär infiziert (100µl/Maus), Serumverdünnungen in PBS+10% FCS

2) Der Titer der Zytoskelett-Antikörper wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz in einer Verdünnungsreihe auf ML-Zellen bestimmt

4.6. Subklassenbestimmung der Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

Da die in der Literatur beschriebene starke Erhöhung der Immunglobulinkonzentration nach LDV-Infektion vor allem die IgG_{2a}-Subklasse betrifft (Michaelidis & Simms, 1977; Coutelier & vanSnick, 1985), war zu prüfen, auf welche Subklassen sich die Autoantikörper und vor allem die Golgi-Antikörper verteilen. Die Subklassen wurden auf fixierten Schä-T-D- und ML-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe von subklassenspezifischen Antikörpern bestimmt. Dabei zeigte sich deutlich, daß zu allen Zeiten nach der Infektion die Golgi-Antikörper in den Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b} dominierten (Tab.8a). Nur gelegentlich konnten Golgi-Antikörper in anderen Subklassen nachgewiesen werden. Selbst zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion (7 Tage p.i.) dominierten die Golgi-Antikörper bereits in den IgG-Subklassen 2a und 2b und reagierten nur schwach mit anti-IgM-Antikörpern.

Im Gegensatz dazu war das Spektrum der Zytoskelettantikörper größer (Tab.8b). Zu allen Zeiten nach der Infektion konnten die Antikörper meist in mehreren Subklassen nachgewiesen werden, allerdings war eine gewisse Dominanz der IgM-Antikörper zu beobachten. Ähnliche Resultate galten auch für die Antikörper gegen Mitochondrien-assoziierten Antigene, die jedoch nicht in der IgG_3-Subklasse nachweisbar waren.

Tab.8a: Subklassenverteilung der Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

1) anti-Golgi-Antikörper[1)]

d p.i.	Maus	IgM[2)]	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3
14	1			+++[3)]	++	
	2			++	++	+
	3		+	++	++	
	4			++	++	
	5			+++	+++	
	6			+++	++	
	7			+++	++	
	8			+++	++	
	9			+++	+++	
	10		+	+++	+++	
28	1		+	+	+	
	2			+	+	
	3			+	+	
	4			++	+	
	5			+++	+	
	6			+++	++	
	7			+++	++	
	8			++	++	
	9			+++	++	
	10			+++	+++	
42	1					
	2			+		
	3			+	+	
	4			+	+	
	5			+	+	
	6			+		
	7			++		
	8			++		
	9			++		
	10					
56	1					
	2			+		
	3			+	+	
	4					
	5			+		
	6			++	+	
	7					
	8			+	+	
	9					
	10					

Fortsetzung Tab.8a:

d p.i.	Maus	IgM	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3
131	1					
	2			+	+	
	3			+	+	
	4			+	+	
	5					
	6					
	7					
	8					
	9			++		
	10					

1) Getestet wurden Seren LDV-infizierter STU-Mäuse zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion auf fixierten Schä-T-D-Zellen

2) Die Subklassen wurden in der indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe von subklassenspezifischen Antikörpern bestimmt

3) Reaktion in der indirekten Immunfluoreszenz: schwache (+), deutliche (++), brilliante (+++) Fluoreszenz

Tab.8b: Subklassenverteilung der Autoantikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

2) anti-Zytoskelett-Antikörper[1)]

d p.i.	Maus	$IgM^{2)}$	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3
14	1	+[3)]	+	+	+	
	2	+		+	+	+
	3					
	4		+	+	+	+
	5			+		
	6					
	7					
	8	+				
	9	++				
	10	++	+	+++	++	
28	1	+		+		+
	2	+		+		
	3	+				
	4	++		+		+
	5	+				
	6	+				+
	7	+				
	8	+				
	9					
	10	++		++	+	
42	1	+				
	2	+	+			
	3	++	+	+	+	
	4	+++		+	+	+
	5	++	+	+		
	6	++			+	
	7	++	+	+		++
	8	++				+
	9	++		+	+	++
	10	+++				
56	1	+				
	2	+				
	3	+	+	+		
	4	++		+	+	+
	5	+	+			
	6	++		+	+	
	7	++			+	+
	8	++	++	++	+	++
	9	++				
	10	+				

Fortsetzung Tab.8b:

d p.i.	Maus	IgM	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3
131	1					
	2			+		
	3	+		++	+	+
	4	+		+	+	
	5	+				
	6	++				
	7	++			+	+
	8	+		+	++	
	9	++				
	10	+		+		

1) Getestet wurden Seren LDV-infizierter STU-Mäuse zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion an fixierten ML-Zellen

2) Die Subklassen wurden in der indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe von subklassenspezifischen Antikörpern bestimmt

3) Reaktion in der indirekten Immunfluoreszenz: schwache (+), deutliche (++), brilliante (+++) Fluoreszenz

4.7. Produktion monoklonaler Autoantikörper

Die Produktion monoklonaler Autoantikörper nach Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA} diente vor allem dem Zweck, monospezifische Antikörper für die Charakterisierung der zellulären Autoantigene zu erhalten.

Die Fusionen wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion der Mäuse durchgeführt, um den günstigsten Zeitpunkt für die Produktion monoklonaler Golgi-Antikörper zu ermitteln. Fusioniert wurden die Milzzellen mit der Myelomzellinie SP2/0-Ag14 (Shulman *et al.*, 1978), die selbst keine eigenen Immunglobulinketten produziert. So war es möglich, monoklonale Antikörper mit einer hohen Spezifität für die Autoantigene zu erhalten.

Insgesamt wurden 12 erfolgreiche Fusionen, alle nach dem beschriebenen Fusionsprotokoll, durchgeführt. Die Dichte erfolgreich fusionierter und wachsender Hybridomzellen lag dabei so hoch, daß pro Napf meist mehrere wachsende Kulturen (bis zu 50) schon 3-4 Tage nach der Fusion zu beobachten waren. Die genaue Zahl wachsender Hybridomkulturen wurde nicht bestimmt, sondern nur die Anzahl der Näpfe mit Wachstum. Etwa 10 bis 14 Tage nach der Fusion war das Wachstum in den Näpfen so weit fortgeschritten, daß die Kulturüberstände in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Schä-T-D- und ML-Zellen getestet werden konnten. Das Hauptinteresse lag dabei an der Identifizierung Golgi-Antikörper produzierender Kulturen. Daneben wurden auch die Kulturen registriert, die Antikörper gegen weitere zelluläre Antigene (Zytoskelett-, Mitochondrien- und Kern-asoziierte Antigene) produzierten.

Die Ergebnisse des Screenings der Kulturüberstände von 10 Fusionen sind in Tab.9 zusammengefaßt. Während bei Fusionen kurz nach der Infektion (4 Tage p.i.), keine oder nur selten Reaktionen mit Golgi-Antigen zu beobachten waren, stieg der Anteil positiver Kulturüberstände mit wachsender Infektionsdauer an und erreichte ein Maximum 9 bis 14 Tage nach der Infektion mit 41 bzw. 37% Golgi-Antikörper produzierender Kulturen. Danach nahm dieser Anteil wieder stetig ab und 58 Tage nach der Infektion konnte beim Screening nur noch ein positiver Kulturüberstand gefunden werden.

Auch der Anteil von Kulturen, die Antikörper gegen Anteile des Zytoskeletts produzierten, lag anfangs niedrig (4 Tage p.i.), stieg im Verlauf der Infektionsdauer an (5-31 Tage p.i.) und ging zu einem späteren Zeitpunkt wieder zurück (58 Tage p.i.).

Reaktionen mit anderen zellulären Antigenen (Mitochondrien, Kern) kamen zu einem meist kleinen Prozentsatz sporadisch vor und zeigten dabei keinen Bezug zum Infektionsverlauf.

Tab.9: Autoantikörper in Hybridomüberständen

Autoantikörper in Hybridomaüberständen nach Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

Fusion	d p.i.	Reaktion von Autoantikörpern in Kulturüberständen (%)[1]			
		anti-Golgi[2]	anti-Zytoskelett[3]	anti-Mitochondrien[3]	anti-Kern[3]
A	n.i.[4]	1	5	2	0
B	4	0	4	7	0
C	5	8	35	8	4
D	6	10	32	8	6
E	7	16	43	13	6
F	9	41	n.d.[5]	7	4
G	14	37	53	3	0
H	21	15	48	19	3
I	31	7	29	14	4
K	58	1	3	0	0

[1] untersucht wurden Kulturüberstände 10-14d nach der Fusion in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Kulturzellen; angegeben ist die Anzahl positiver Überstände/Gesamtzahl getesteter Näpfe

[2] getestet auf Schä-T-D-Zellen

[3] getestet auf ML-Zellen

[4] n.i.: nicht infiziert

[5] n.d.: nicht durchgeführt

Klonierung:

Die Klonierung Autoantikörper produzierender Hybridomkulturen erfolgte in drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen in 96 well-Platten in HT-Medium mit Peritonealmakrophagen als "feeder"-Zellen. Bereits 4 bis 5 Tage nach der Klonierung wurden die Platten auf das Wachstum von Zellen untersucht, um zweifelsfrei Einzelklone zu bestimmen. Die Klone wurden mit HT-Medium gefüttert und die Kulturüberstände etwa 14 Tage nach der Klonierung in der indirekten Immunfluoreszenz auf Schä-T-D- und ML-Zellen getestet. Wie in Tab.10 dargestellt, ergaben sich bei der Klonierung Golgi-Antikörper produzierender Hybridome ganz unterschiedliche Klonierungsausbeuten, die die Stabilität der einzelnen produzierenden Zellen dokumentieren. Während bei 62% der Hybridome nach der Klonierung Antikörper produzierende Klone mit unterschiedlicher Effizienz nachweisbar waren, wurden bei 38% der Klonierungen keine positiven Klone entdeckt. Nach Reklonierung der Antikörper sezernierenden Klone lag der Anteil stabiler Klone bei 81%. Diese wurden weitervermehrt und standen für detailliertere Untersuchungen zur Verfügung.

Wie die Klonierungsausbeuten bei Autoantikörpern gegen weitere zelluläre Strukturen aussahen, ist in Tab.11 dargestellt. Etwa 60% der Hybridome, die Antikörper gegen Zytoskelett-, Kern- oder Mitochondrien-assoziierte Antigene produzierten, ließen sich mit unterschiedlicher Effizienz klonieren. Auffällig war, daß nach der Reklonierung entweder alle oder keiner der getesteten Überstände die spezifische Reaktion in der Immunfluoreszenz zeigte.

Tab.10: Klonierung Golgi-Antikörper-produzierender Hybridomkulturen

Fusion	d p.i.	Hybridom-nr.	positive Klone[1] (%)	positive Subklone[1] (%)
D	6	4	46	96
E	7	58	83	9
		81	0	-
F	9	1	3	0
		2	40	25
		3	0	-
		4	33	100
		5	62	93
		6	0	-
		7	36	100
		8	0	-
		9	0	-
		10	17	0
		18	11	0
G	14	5	24	89
		36	45	82
		37	0	-
		47	19	50
		49	4	0
		55	5	100
		58	0	-
		65	33	100
		70	15	90
		72	14	100
		81	59	90
		86	7	100
		95	33	90
		100	0	-
		114	0	-
		119	44	100
		122	0	-
		140	0	-
H	21	2	0	-
		3	0	-

1) Klonierungen wurden in drei Verdünnungsstufen durchgeführt (s.3.11.). Überstände von Klonen wurden in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Schä-T-D-Zellen auf Anwesenheit von Golgi-Antikörpern getestet; die Zahlen geben den prozentualen Anteil Antikörper-produzierender Klone zur Gesamtzahl der getesteten Klone an.

Tab.11: Klonierung Autoantikörper-produzierender Hybridomkulturen

Fusion	d p.i.	Hybridom-nr.	Spezifität[1)]	pos. Klone (%)[2)]	pos. Subklone (%)[2)]
C	5	1	anti-CS	90	100
		3	anti-CS	10	0
		5	anti-CS	20	0
		7	anti-Kern	90	100
D	6	12	anti-CS	0	-
E	7	36	anti-CS	21	100
		78	anti-Kern	0	-
		115	anti-Kern	0	-
H	21	17	anti-MAA	40	100
I	31	5	anti-CS	0	-
L	31	1	anti-MAA	80	100

1) Reaktion der Kulturüberstände in der indirekten Immunfluoreszenz auf ML-Zellen, CS: Zytoskelett, MAA: Mitochondrien-assoziiertes Antigen

2) Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der in der Immunfluoreszenz positiv reagierenden Kulturüberstände zur Gesamtzahl der getesteten Überstände an

Ascites-Produktion:

Zur Gewinnung großer Mengen an monoklonalen Antikörpern wurden Hybridomzellen in Pristan-behandelten F_1-Mäusen von Balb/c und STU intraperitoneal vermehrt und die entstehende Ascites-Flüssigkeit gewonnen. Dabei erwies es sich als schwierig, vor allem Golgi-Antikörper produzierende Zellen zu vermehren, da die Mäuse oft kurz nach dem Transfer starben, ohne daß sich vorher größere Mengen an Ascites-Flüssigkeit gebildet hatten. Die gewonnene Flüssigkeit wurde durch niedertourige Zentrifugation geklärt und der Antikörpertiter in der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt. Dabei ergaben sich für Golgi-Antikörper Werte, die zwischen 8000 und 30000 lagen.

Subklassenbestimmung monoklonaler Autoantikörper

Es wurde geprüft, ob nach den Befunden bei der Subklassenbestimmung von monoklonalen Autoantikörpern im Vollserum nach Infektion mit LDV_{AGIA} sich auch die monoklonalen Autoantikörper gegen zelluläre Antigene in ähnlicher Weise verteilen. Dazu wurden mit der Technik der doppelten Immundiffusion die Ig-Subklassen im Kulturüberstand der Klone bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab.12 zusammengefaßt. Die Golgi-Antikörper verteilen sich hauptsächlich auf die Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b}. Lediglich in Fusionen, die kurz nach der Infektion durchgeführt worden waren (6 und 7 Tage p.i.), konnten nur IgM-Antikörper produzierende Hybridome kloniert werden. Monoklonale Antikörper gegen andere zelluläre Antigene waren, bis auf eine Ausnahme, immer in der IgM-Klasse zu finden.

Tab.12: Subklassenverteilung monoklonaler Autoantikörper

Spezifität[1]	Fusion	d p.i.	Ig-Subklasse[2]				
			IgM	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3
anti-Golgi	D	6	1	-	-	-	-
	E	7	1	-	-	-	-
	F	9	-	-	3	1	-
	G	14	1	-	5	5	-
	K	58	-	-	-	1	-
anti-CS	C	5	-	-	1	-	-
	E	7	1	-	-	-	-
	M	21	1	-	-	-	-
anti-MAA	H	21	1	-	-	-	-
	L	32	1	-	-	-	-
Anti-Kern	C	5	1	-	-	-	-

1) Die Spezifität der Autoantikörper wurde in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten Schä-T-D- und ML-Zellen bestimmt, CS: Zytoskelett, MAA: Mitochondrien-assoziierte Antigene

2) Die Subklasse wurde mit Hilfe von subklassenspezifischen Antikörpern durch doppelte Immundiffusion im Kulturüberstand der Hybridome bestimmt

4.8. Charakterisierung der monoklonalen Autoantikörper

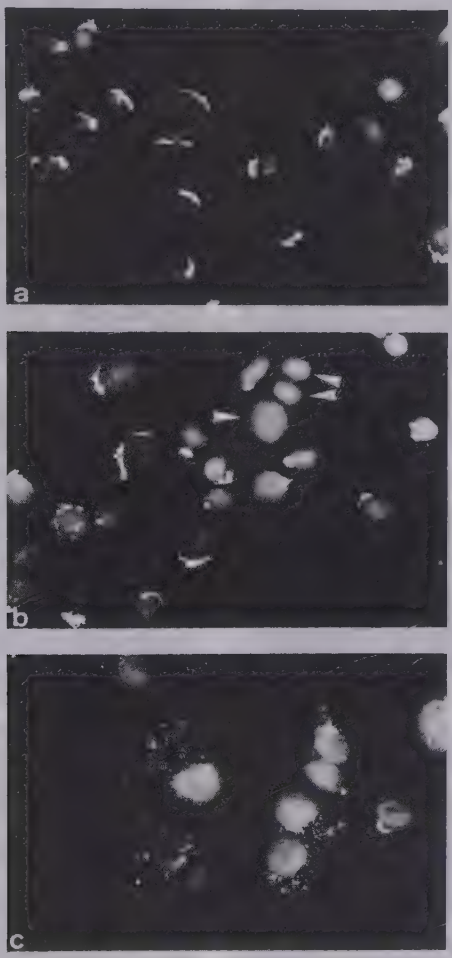
4.8.1. Spezifität der Antikörper gegen zelluläre Antigene

Antikörper gegen Golgi-Antigene:

Das Reaktionsmuster von monoklonalen Golgi-Antikörpern wurde vergleichend an Zellen untersucht, die sich in der Interphase bzw. in verschiedenen Mitosestadien befinden. Ebenso wurde geprüft, wie die Golgi-Antigene nach Vorbehandlung von Kulturzellen mit Reagenzien wie Monensin oder Colcemid durch monoklonale Antikörper dargestellt werden. In Abb.2 wird gezeigt, daß die monoklonalen Golgi-Antikörper (hier der Antikörper F20/36-4-1) im kernnah gelegenen Bereichen von Schä-T-D-Zellen in der Interphase reagieren (Abb.2a), eine Lokalisation, wie sie für den Golgi-Apparat typisch ist. In der Mitose werden die Strukturen der Organelle aufgelöst und die Reaktion der Antikörper zeigt nur eine schwache, diffuse Färbung des gesamten Plasmas (Abb.2b, durch Pfeile gekennzeichnet). Werden die Zellen mit Monensin oder Colcemid behandelt, Substanzen, die die räumliche Anordnung der Elemente des Golgi-Apparates in der Zelle verändern, läßt sich mit den Antikörpern eine diffus im Plasma verteilte, tröpfchenartige Fluoreszenz beobachten. Das Reaktionsmuster nach Behandlung von Schä-T-D-Zellen mit Monensin ist in Abb.2c gezeigt.Wie sich die Organisation der Organelle in verschiedenen Stadien der Mitose darstellt, ist detaillierter in Abb.3 an NRK-Zellen gezeigt. Parallel zur FITC-angezeigten Immunreaktion mit dem monoklonalen Golgi-Antikörper P58-4-1 wurden die Zellen mit dem an DNA bindenden Hoechst 33.285-Farbstoff behandelt, um die einzelnen Mitosephasen identifizieren zu können. Zu Beginn der Zellteilung in der Prophase beginnt sich die Struktur der Golgi-Organelle langsam aufzulösen (Abb.3a, oben links). Nach der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene während der Metephase läßt sich nur noch eine diffuse, über die gesamte Zelle verteilte Fluoreszenz feststellen (Abb.3a, unten rechts und Abb.3c). Dieselbe Beobachtung macht man auch bei Zellen in der Anaphase, in der die verdoppelten Chromosomensätze getrennt werden (Abb.3e, rechts). Zu Beginn und im weiteren Verlauf der Telophase, in der sich die Tochterkerne bilden, rekonstituiiert sich auch der Golgi-

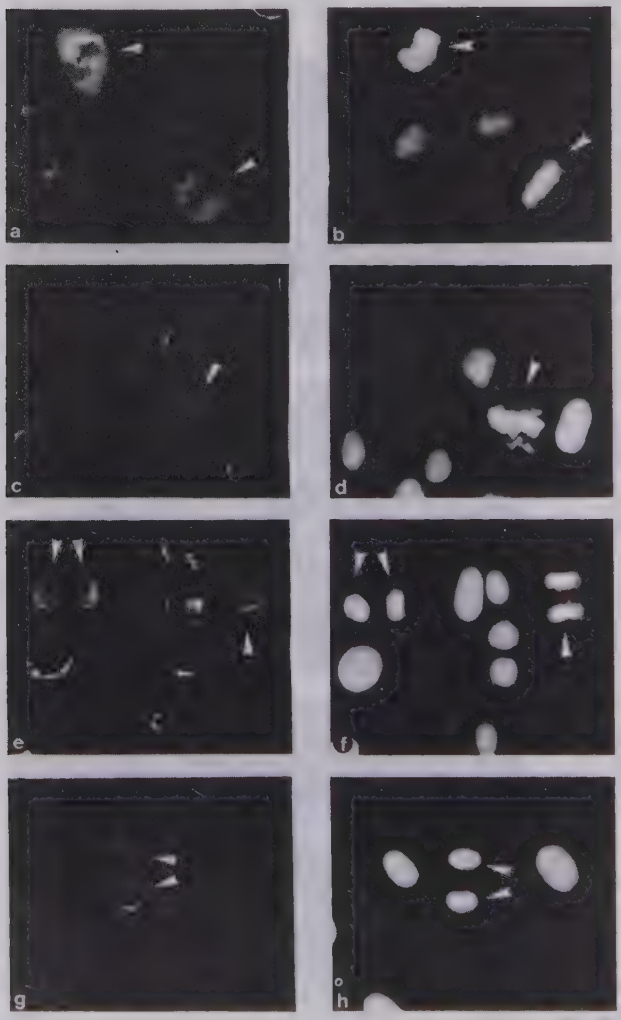
Apparat und kann in seiner typischen kernnahen Anordnung wieder markiert werden (Abb.3e, links oben und Abb.3g, Mitte).

Abb.2: Reaktionsmuster monoklonaler anti-Golgi-Autoantikörper



Reaktionsmuster des monoklonalen anti-Golgi-Antikörpers F20/36-4-1 auf fixierten Schä-T-D-Zellen; a und b: Zellen unbehandelt, Mitosestadien sind durch Pfeile gekennzeichnet; c: Zellen mit Monensin behandelt.

Abb.3: Reaktionsmuster monoklonaler Golgi-Autoantikörper in der Immunfluoreszenz auf mitotischen Zellen



Reaktionsmuster des monoklonalen Golgi-Antikörpers P58-4-1 auf fixierten NRK-Zellen während verschiedener Mitosestadien (Pfeile)
a,c,e und g: Antikörperreaktion in der indirekten Immunfluoreszenz
b,d,f und h: DNA-Färbung mit Hoechst33.285

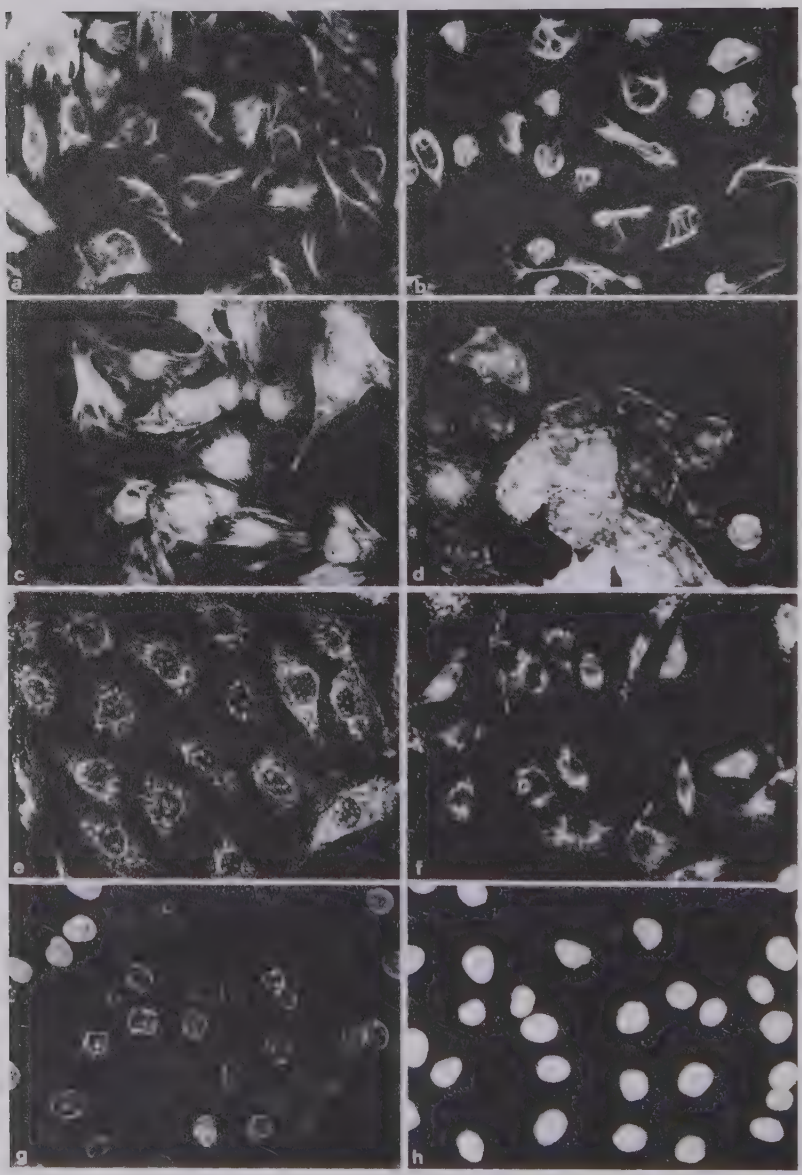
Antikörper gegen weitere zelluläre Antigene:

Bei Antikörpern, die gegen Anteile des Zytoskeletts gerichtet waren, ließen sich mindestens zwei unterschiedliche Reaktionsmuster beobachten: die Erkennung von Intermediärfilamenten (Abb.4a) und die von Mikrofilamenten (Abb.4c). Unterscheiden ließen sich diese Reaktionen durch Behandlung der Zellen mit Colcemid bzw. Cytochalasin B. In Colcemid-behandelten ML-Zellen waren die Intermediärfilamente kollabiert und zeigten ein typisches "coiling"-Muster (Abb.4b). Cytochalasin B-Behandlung von ML-Zellen dagegen führte zur Auflösung der Mikrofilamente (Abb.4d).

Antikörperreaktionen gegen Mitochondrien-assoziierte Antigene (Abb.4e), zeigten im Vergleich mit einem Vitalfarbstoff, der spezifisch Mitochondrien färbt (Rhodamin 123, Kodak) (Abb.4f), dasselbe Muster in der Fluoreszenz auf ML-Zellen.

Antikörper, die Kern-assoziierte Antigene erkannten (Abb.4g), ließen sich mit dem Reaktionsmuster von Kernfarbstoffen, wie Hoechst 33.285 vergleichen (Abb.4h). Im Gegensatz zu dem Farbstoff, der an DNA bindet und in mitotischen Zellen deutlich die Chromosomen färbt, zeigte der hier untersuchte Antikörper ein Muster auf ML-Zellen, das auf die Reaktion mit Kernmembran-assoziierten Antigenen schließen läßt. FITC-gefärbte Kerne zeigten in den fixierten Zellen eine leicht faltige Struktur und die Antikörperreaktion war in mitotischen Zellen, in denen die Kernmembran aufgelöst ist, nicht zu sehen.

Abb.4: Reaktionsmuster monoklonaler Autoantikörper in der indirekten Immunfluoreszenz



Reaktionsmuster von monoklonalen Autoantikörpern gegen verschiedene zelluläre Antigene in der indirekten Immunfluoreszenz auf Ml-Zellen: a: FX/5-2-3 auf unbehandelten und b: auf Colcemid behandelten ML-Zellen; c: F12/1-1-4 auf unbehandelten und d: auf Cytochalasin B-behandelten ML-Zellen; e: F16/17-2-1 auf unbehandelten Ml-Zellen, f: Färbung vitaler ML-Zellen mit dem Mitochondrienfarbstoff Rhodamin 123 (Kodak); g: F12/7-1-2 auf unbehandelten ML-Zellen, h: DNA-Färbung mit Hoechst 33.285-Farbstoff

4.8.2. Reaktionsspektrum der monoklonalen Autoantikörper auf verschiedenen Kulturzellen

Beim routinemäßigen Screening der Kulturüberstände von anti-Golgi-Autoantikörper produzierenden Hybridomen in der Immunfluoreszenz auf Schä-T-D-Zellen waren, abgesehen von der Fluoreszenzintensität, keine Unterschiede im Reaktionsmuster feststellbar. Es ließ sich auch somit nicht die Frage beantworten, ob die monoklonalen Golgi-Antikörper alle dasselbe Antigen oder verschiedene antigene Detrminanten erkennen. Außerdem war zu prüfen, wie stark die Antigene bei verschiedenen Tierspezies konserviert sind, nachdem bekannt war, daß der Golgi-Apparat von polyklonalen Serumantikörpern aus LDV_{AGIA}-infizierten Tieren in praktisch allen getesteten Zellinien erkannt wird (Weiland *et al.*, 1984, Weiland *et al.*, 1987). Getestet wurden die Kulturüberstände aller Hybridome, die Golgi-Antikörper produzierten, auf fixierten Kulturzellen verschiedener Spezies in der indirekten Immunfluoreszenz. Daneben wurden auch noch die Reaktionsspektren von Autoantikörpern mit anderer Spezifität bestimmt. Die Ergebnisse zeigten (Tab.13), daß im Bereich des Golgi-Apparates mehrere verschiedene Antigene erkannt wurden, da die einzelnen monoklonalen Antikörper in ihrem Reaktionsmuster stark divergierten. Neben Antikörpern, die den Golgi-Apparat in allen getesteten Zellen erkannten (z.B. F20/55-1-2), fanden sich auch Hybridome (z.B. F20/36-4-1), deren Antikörper nur Golgi-Antigen der Targetzelle erkannten, die beim Screening verwendet wurde (Schä-T-D). Dazwischen gab es verschiedene Abstufungen im Reaktionsmuster: Antikörper, die den Golgi-Apparat in allen Zellen außer in Fischzellen erkannten (z.B. F20/47-4-4 oder F20/65-1-4) oder Antikörper, die Golgi-Antigen nur in wenigen Säugerzellen markieren konnten (z.B. F20/5-3-4).

Das Reaktionsmuster von Autoantikörpern mit anderer Spezifität (anti-Zytoskelett, anti-Kern, anti-Mitochondrien) wirkte dagegen einheitlicher. Alle Antikörper waren, bis auf zwei Ausnahmen (F12/1-1-4, ein Mikrofilament-spezifischer Antikörper, negativ auf Vero-Zellen und F12/7-1-2, ein Antikörper der Kern-assoziiertes Antigen erkennt, negativ auf MEF), in der Lage, Antigen spezifisch in allen getesteten Zellen zu erkennen.

Tab.13: Reaktionsmuster monoklonaler Autoantikörper auf fixierten Kulturzellen

Reaktionsmuster monoklonaler Autoantikörper auf fixierten Kulturzellen

Antikörper	Spezifität[1]	Ig-Subklasse	Kulturzellen: Maus Schä	Maus MCA	Maus MEF	Ratte 208F	Ratte RS1	Ratte NRK	Ratte XC	Nerz ML	Affe Vero	Mensch HF	Rind MDBK	Huhn CEF	Fisch RTG	Fisch CHSE
O4-1-2	a-Golgi	IgM	++[2]	n.t.[3]	+	++	+	+	++	+	n.t.	+	n.t.	++	++	-
P58-4-1	a-Golgi	IgM	+++	n.t.	++	++	-	++	++	+++	n.t.	++	n.t.	+++	+	+
F9/2-4-5	a.Golgi	IgG_{2a}	++	n.t.	n.t.	++	++	++	n.t.	+	n.t.	+	n.t.	-	-	+
F9/4-1-4	a-Golgi	IgG_{2b}	++	n.t.	n.t.	++	++	++	n.t.	+	n.t.	-	n.t.	+	-	-
F9/5-3-1	a-Golgi	IgG_{2a}	++	n.t.	n.t.	+	n.t.	-	n.t.	+	n.t.	-	n.t.	-	-	-
F9/7-1-4	a-Golgi	IgG_{2a}	+++	n.t.	n.t.	+++	+++	+++	n.t.	++	n.t.	+++	n.t.	+++	-	++
F9/7-2-1	a-Golgi	IgG_{2a}	++	n.t.	n.t.	++	+	-	n.t.	-	n.t.	++	n.t.	-	-	-
F20/5-3-4	a-Golgi	IgG_{2b}	++	+	++	-	+	-	+	-	+++	n.t.	+	-	-	-
F20/36-4-1	a-Golgi	IgM	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	-	-	-	-
F20/47-4-4	a-Golgi	IgG_{2a}	+++	+	+	+	+	++	++	++	++	n.t.	+	+	-	-
F20/55-1-2	a-Golgi	IgG_{2b}	+++	++	+++	++	++	++	++	+	+++	n.t.	+	+	+	++
F20/65-1-4	a-Golgi	IgG_{2a}	+++	++	++	+	+	++	++	++	+++	n.t.	+	++	-	-
F20/70-1-4	a-Golgi	IgG_{2b}	++	+	+	+	+	-	++	-	++	n.t.	-	-	-	-
F20/72-3-1	a-Golgi	IgG_{2b}	+++	+	++	++	++	+	++	-	++	n.t.	-	-	-	-
F20/81-5-3	a-Golgi	IgG_{2a}	+++	+	+++	++	++	+	++	+	+++	n.t.	-	-	-	-
F20/86-1-4	a-Golgi	IgG_{2b}	+++	+	+++	++	++	++	++	-	+++	n.t.	-	-	-	-
F20/95-3-1	a-Golgi	IgG_{2a}	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+	++	n.t.	-	-	-	-
F20/119-6-2	a-Golgi	IgG_{2a}	+++	++	+++	+++	+++	++	++	-	++	n.t.	-	-	-	-
M22-1-4	a-IF	IgM	++	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+++	n.t.	+++	+++	n.t.	+++	+++	n.t.	+++
F12/1-1-4	a-MF	IgG_{2a}	++	n.t.	+	+	+	+	+	++	-	++	++	++	+	+
F12/7-1-2	a-Kern	IgM	+	n.t.	-	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+
F16/17-2-1	a-MAA	IgM	+++	n.t.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

1) Die Bestimmung der Spezifität erfolgte in der indirekten Immunfluoreszenz an fixierten Kulturzellen.
a-Golgi: Reaktion mit Golgi-Antigenen
a-IF: Reaktion mit Intermediärfilamenten
a-MF: Reaktion mit Mikrofilamenten
a-Kern: Reaktion mit Kern-assoziiertem Antigen
a-MAA: Reaktion mit Mitochondrien-assoziiertem Antigen

2) -, +, ++, +++: Maß der Fluoreszenzintensität

3) n.t.: nicht getestet

4.9. Charakterisierung der Golgi-Antigene

4.9.1. Radioimmunpräzipitation und Gelelektrophorese

Metabolischer Einbau radioaktiver Aminosäuren:

Um eine ausreichende Markierung der Golgi-Antigene zu erzielen, erwies es sich als nötig, bei einer Markierungszeit von 5 Stunden, relativ große Mengen an radioaktiv markierten Aminosäuren einzusetzen (0,5 bis 2,5mCi = 18,5 bis 92,5MBq). Die Einbaurate schwankte dabei, in Abhängigkeit von der verwendeten Zellinie, zwischen 2% (Einbau in Schä-T-D-(TSA^-)-Zellen) und 18% (Einbau in Schä-T-D-(TSA^+)-Zellen).

In den einzelnen Versuchsansätzen konnten durch monoklonale Golgi-Antikörper zwischen $2x10^4$ und $1,6x10^7$ cpm (= $3,3x10^2$ bis $2,7x10^5$Bq) präzipitiert werden. Diese Aktivität war ausreichend, um nach der gelelektrophoretischen Analyse Signale zu erhalten, die nach einer Filmexpositionszeit von 1 bis 14 Tagen deutlich sichtbare Banden lieferten.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Um die Vielzahl der möglichen Antigene, deren Molekulargewicht vorher nicht bekannt war, auf einem Gel erfassen zu können, erwies sich ein kontinuierliches Gradientengel von 2,5 bis 20% Polyacrylamid als geeignet. Durch die 20%ige Gelkonzentration im unteren Bereich wurden die niedermolekularen Proteine in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit während des Laufs gebremst, während im oberen Bereich des Gels mit 2,5% hochmolekulare Proteine noch einwandern konnten. Auf diese Weise wurde ein Molekulargewichtsbereich von ca. 20kD bis etwa 500kD erfasst.

Präzipitierte Antigene:

Für die Immunpräzipitation wurde nur das Gesamtlysat bzw. die Triton-lösliche Fraktion markierter Zellen eingesetzt. Auf eine Zellfraktionierung zur Isolierung von Membranen des Golgi-Apparates wurde verzichtet, um eine Zerstörung antigener Determinanten durch experimentelle Bedingungen zu vermeiden. Denn von Befunden bei der Immunfluoreszenz war bekannt, daß die Erkennung der Golgi-Antigene stark von der Behandlung der Zellen

abhängt (Temperatur, Pufferbedingungen, etc.). In mehreren Immunpräzipitationsexperimenten gelang die spezifische Präzipitation von Antigenen durch die monoklonalen Golgi-Antikörper. Nicht in jedem Fall ließen sich alle Ergebnisse reproduzieren, aber aus der Summe der experimentellen Befunde ergaben sich deutliche Hinweise auf vier spezifisch erkannte Antigene:

1) Ein oder zwei Antigene mit einem Molekulargewicht über 300kD, die in manchen Immunpräzipitationen als einfache oder als Doppelbande auftraten.
2) Ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 145kD.
3) Ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 96kD.
4) Ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 80kD.

Neben diesen vier Antigenen wurden gelegentlich noch andere spezifische Banden beobachtet, die aber nicht reproduzierbar waren oder sich den eben beschriebenen vier Hauptantigenen zuordnen ließen, da das Wanderungsverhalten der Proteine im Gradientengel differieren konnte. Vor allem Antigene im niedermolekularen Bereich konnten mit diesen Gelen nicht genau untersucht werden und wurden deshalb durch Immunoblotting näher charakterisiert.

In den einzelnen Experimenten stellten sich die Ergebnisse wie folgt dar:

1) Immunpräzipitation bei Schä-T-D-Zellen (TSA^+) (Abb.5):

Hier konnten alle vier Hauptantigene nachgewiesen werden, wobei zu beobachten war, daß einige Antikörper in der Lage waren, mehrere dieser Antigene gleichzeitig zu präzipitieren. So erkannten die Antikörper F20/86-1-4 und F20/95-3-1 nur das 145kD-Antigen, die Antikörper F20/47-4-4 und F20/65-1-4 präzipitierten darüber hinaus das 96kD-Antigen. F9/7-2-1 und K21-4-1 erkannten noch zusätzlich das über 300kD große Antigen. Der Antikörper F20/119-6-2 dagegen zeigte nur eine spezifische Bande bei 80kD.

2) Immunpräzipitation bei Schä-T-D-Zellen (TSA^-) (Abb.6):

Abweichend von den Ergebnissen bei TSA^+-Zellen wurde das hochmolekulare Antigen mit einem Molekulargewicht >300kD nur von F9/7-2-1 erkannt, sowie das 96kD-Protein nur von K21-4-1. Das 145kD-Antigen dagegen konnte von mehreren Antikörpern (F20/47-4-4, F20/86-1-4, F20/95-3-1 und K21-4-1) präzipitiert werden. Gründe für die Unterschiede zu TSA^+-Zellen könnten in dem deutlich

schwächeren Einbau der radioaktiven Aminosäuren in TSA$^-$-Zellen zu suchen sein.

3) Immunpräzipitation bei RS1-Zellen (Abb.7):

Bei RS1-Zellen als Vertreter für eine Rattentumorzelle konnten von den vier Hauptantigenen nur die beiden mit 145kD und 96kD präzipitiert werden. Dabei wurde das 145kD-Protein von allen eingesetzten Antikörpern erkannt, während nur drei Antikörper (F20/47-4-4, F20/65-1-4 und K21-4-1) in der Lage waren, das 96kD-Antigen zu präzipitieren.

4) Immunpräzipitation bei 208F-Zellen:

Bei 208F-Zellen als Verteter für eine nicht transformierte Rattenzelle war der Einbau radioaktiver Aminosäuren so gering, daß keiner der eingesetzten Golgi-Antikörper in der Lage war, Antigen spezifisch zu präzipitieren.

5) Immunpräzipitation nach Lyse von Schä-T-D-(TSA$^+$)-Zellen mit verschiedenen Puffern (Abb.8):

Verglichen wurde das Muster der präzipitierten Antigene nach Lyse der Zellen mit Triton-A, einem Puffer, der TritonX-100 in einer physiologischen Salzkonzentration enthält, bzw. mit Extraktionspuffer, in dem TritonX-100 in einer sehr hohen Salzkonzentration vorliegt. In Immunfluoreszenzstudien war nur der Extraktionspuffer in der Lage, sämtliche Golgi-Antigene aus der Zelle herauszulösen, während Behandlung der Zellen mit Triton-A noch den Nachweis von Golgi-Antigen durch Antikörper erlaubte.

a) Lyse der Zellen mit Triton-A:

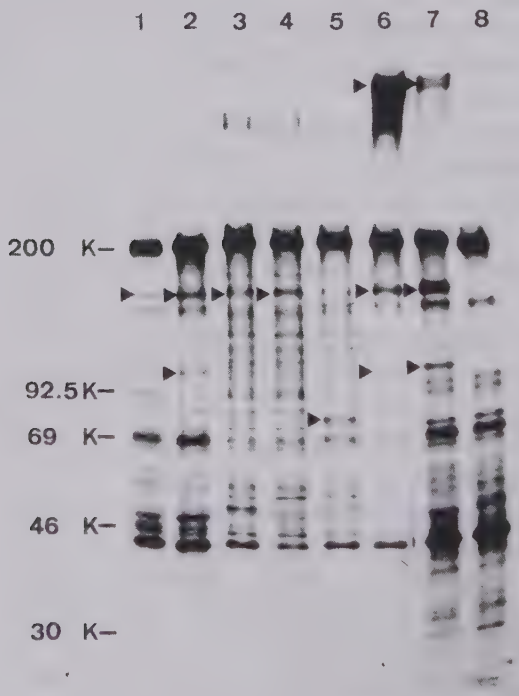
Die Analyse der präzipitierten Antigene ergab ein Muster, das dem unter 1) beschriebenen und in Abb.5 dargestellten vergleichbar war, wenngleich aufgrund einer Veränderung der Kontinuität des Gradientengels die Molekulargewichte der einzelnen Banden divergieren. So fand sich das 145kD-Protein hier im Bereich von 170kD wieder, sowie das 96kD-Protein bei etwa 110kD. Der Antikörper F20/119-6-2 präzipitierte auch hier das 80kD-Antigen. Zusätzlich zur Abb.5 ließen sich hier im niedermolekularen Bereich zwei weitere Banden bei 54kD (F9/7-2-1) und bei 50kD (F20/65-1-4) beobachten.

b) Lyse der Zellen mit Extraktionspuffer:

Von den vier Hauptantigenen konnten in diesem Versuchsansatz nur das 145kD-Antigen (hier als 170kD) präzipitiert werden. Wie

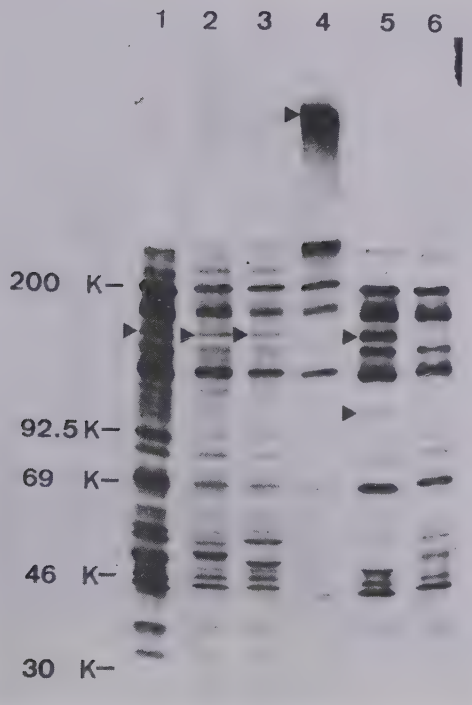
im Parallelansatz mit der Triton-A-löslichen Fraktion der Zellen präzipitierte der Antikörper F20/65-1-4 zusätzlich ein kleines Antigen bei 50kD.

Abb.5: Gelelektrophoretische Analyse nach Immunpräzipitation von Lysat metabolisch markierter Schä-T-D-Zellen (TSA^+) mit monoklonalen Golgi-Antikörpern



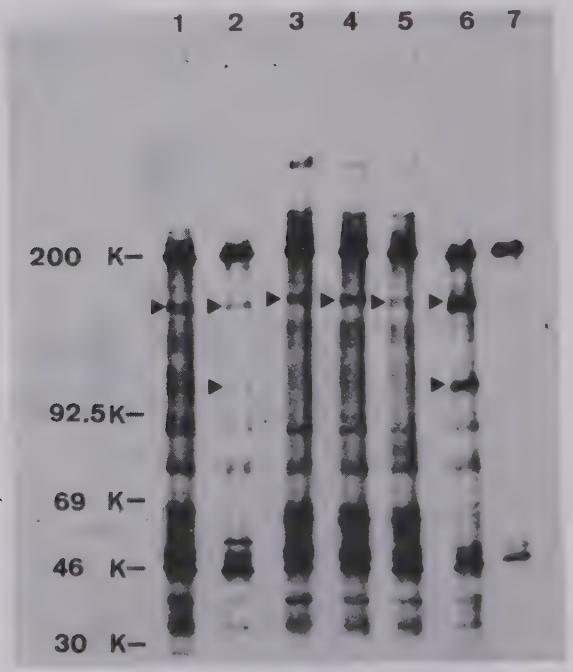
Schä-T-D-Zellen (TSA+) wurden metabolisch mit ^{35}S-Met und ^{35}S-Cys markiert und in der Radioimmunpräzipitation mit monoklonalen Golgi-Antikörpern eingesetzt. Die Analyse der Präzipitate erfolgte auf einem 2,5-20% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen 1: F20/47-4-4, 2: F20/65-1-4, 3: F20/86-1-4, 4: F20/95-3-1, 5: F20/119-6-2, 6: F9/7-2-1, 7: K21-4-1 und 8: D56-1-X (Negativkontrolle: Antikörper mit anderer Spezifität)

Abb.6: Gelelektrophoretische Analyse nach Immunpräzipitation von Lysat metabolisch markierter Schä-T-D-Zellen (TSA^-) mit monoklonalen Golgi-Antikörpern



Schä-T-D-Zellen (TSA-) wurden metabolisch mit ^{35}S-Met und ^{35}S-Cys markiert und in der Radioimmunpräzipitation mit monoklonalen Golgi-Antikörpern eingesetzt. Die Analyse der Präzipitate erfolgte auf einem 2,5-20% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen 1: F20/47-4-4, 2: F20/86-1-4, 3: F20/95-3-1, 4: F9/7-2-1, 5: K21-4-1 und 6: D56-1-X (Negativkontrolle: Antikörper mit anderer Spezifität)

Abb.7: Gelelektrophoretische Analyse nach Immunpräzipitation von Lysat metabolisch markierter RS1-Zellen mit monoklonalen Golgi-Antikörpern



RS1-Zellen wurden metabolisch mit ^{35}S-Met und ^{35}S-Cys markiert und in der Radioimmunpräzipitation mit monoklonalen Golgi-Antikörpern eingesetzt. Die Analyse der Präzipitate erfolgte auf einem 2,5-20% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen.
1: F20/47-4-4, 2: F20/65-1-4, 3: F20/86-1-4, 4: F20/95-3-1, 5: F20/119-6-2, 6: K21-4-1 und 7: D56-1-X (Negativkontrolle: Antikörper mit anderer Spezifität)

Abb.8: Gelelektrophoretische Analyse nach Immunpräzipitation von metabolisch markierten Schä-T-D-Zellen (TSA^+) mit monoklonalen Golgi-Antikörpern unter verschiedenen Lysebedingungen

Schä-T-D-Zellen (TSA+) wurden metabolisch mit ^{35}S-Met und ^{35}S-Cys markiert und nach Lyse durch verschiedene Puffersysteme in der Radioimmunpräzipitation mit monokonalen Golgi-Antikörpern eingesetzt. Die Analyse der Präzipitate erfolgte auf einem 2,5-20% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen.
1-7: Lyse der Zellen mit Triton-A (Puffer mit physiologischer Salzkonzentration); 8-12: Lyse der Zellen mit Extraktionspuffer (Triton-haltiger Puffer mit hoher Salzkonzentration)
1 und 8: F20/65-1-4, 2: F20/86-1-4, 3 und 9: F20/119-6-2, 4,5 und 10: F9/7-2-1 (4 kürzer exponiert als 5), 6 und 11: K21-4-1, 7 und 12: D56-1-X (Negativkontrolle: Antikörper mit anderer Spezifität)

4.9.2. Immunoblotting

Während bei der Radioimmunpräzipitation, die nur den Nachweis radioaktiv markierbarer Antigene erlaubt, die gelelektrophoretische Analyse der Antigene erst nach der Immunreaktion erfolgt und der kritische Schritt für die Erhaltung der Antigenität die Lyse der Zellen darstellt, findet im Immunoblottingverfahren die Immunreaktion erst nach der Auftrennung der zellulären Proteine im Gel und dem Transfer statt. Hierbei ist nicht immer gewährleistet, daß auch nach der SDS-Gelanalyse, die immer unter reduzierenden Bedingungen gefahren wurde, die Antigenität noch befriedigend erhalten ist. Ein weiteres Problem ist der Transfer von Proteinen mit einem hohen Molekulargewicht (>100kD) auf die Membran, der auch durch Verwendung von Puffern mit hohen Salzkonzentrationen und Verwendung hoher Stromstärken nicht immer gelingt. So ist unter anderem auch zu erklären, warum der Einsatz eines Antikörpers in der Immunpräzipitation und im Immunoblotting-Verfahren nicht immer zu übereinstimmenden Ergebnissen führt.

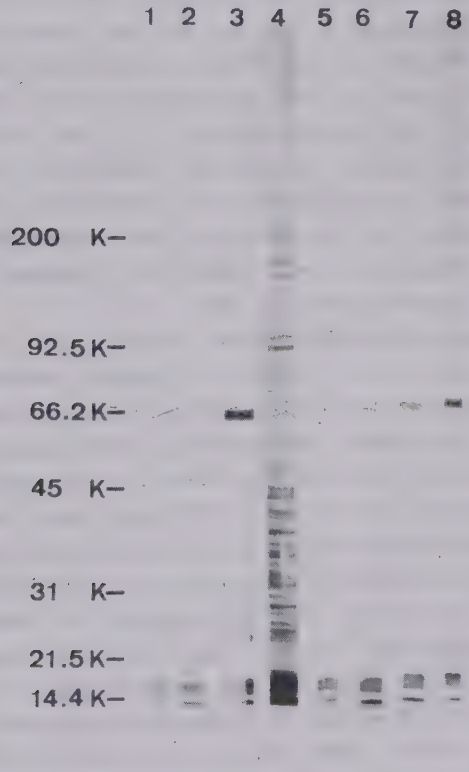
Zusätzlich zu den Befunden aus der Radioimmunpräzipitation konnte hier gezeigt werden, daß auch mit der Methode des Immunoblottings eine spezifische Markierung von Antigenen durch anti-Golgi Antikörper möglich ist (Abb.9). Vor allem Antigene mit einem niedrigen Molekulargewicht (<50kD), die in der RIP nur schwer oder überhaupt nicht nachzuweisen waren, konnten im Immunoblotting-Verfahren wiederholt beobachtet werden. Neben einigen unspezifischen Banden, die auch bei Normalserum bzw. bei einem monoklonalen, nicht gegen Golgi-Antigen gerichteten Antikörper zu sehen waren, markierte vor allem das Antiserum vier spezifische Antigene:

1) Ein Antigen, das auch schon in der Immunpräzipitation beobachtet werden konnte, bei 95kD
2) Ein Antigen bei 58kD
3) Ein Antigen mit 43kD und
4) ein Antigen mit 36kD

Zusätzlich zur Reaktion mit Vollserum waren vier der eingesetzten monoklonalen Antikörper in der Lage, Golgi-Antigen spezifisch zu markieren: Der Antikörper F20/47-4-4 das 95kD-Antigen, der Antikörper 04-2-1 das 43kD-Antigen, der Antikörper

F20/81-5-3 ein Antigen bei 110kD und der Antikörper F9/7-2-1 ein kleines Antigen mit 25kD.
Der Einsatz viraler Antikörper auf Schä-T-D-Zellen im Immunoblotting-Verfahren führte zu keiner spezifischen Markierung der von den Golgi-Antikörpern erkannten Antigene.

Abb.9: Immunoblotting mit monoklonalen Golgi-Antikörpern nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Schä-T-D-Zellysat



Schä-T-D-Zellen wurden mit Probenpuffer lysiert und auf einem 2,5-20% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Immobilon-Membranstreifen übertragen und mit monoklonalen Golgi-Antikörpern inkubiert.
1: STU-Normalserum, 2: anti-Golgi-Serumpool, 3: F9/7-2-1, 4: F20/47-4-4, 5: F20/81-5-3, 6: F20/86-1-4, 7: O4-2-1, 8: D56-1-X (Negativkontrolle: Antikörper mit anderer Spezifität)

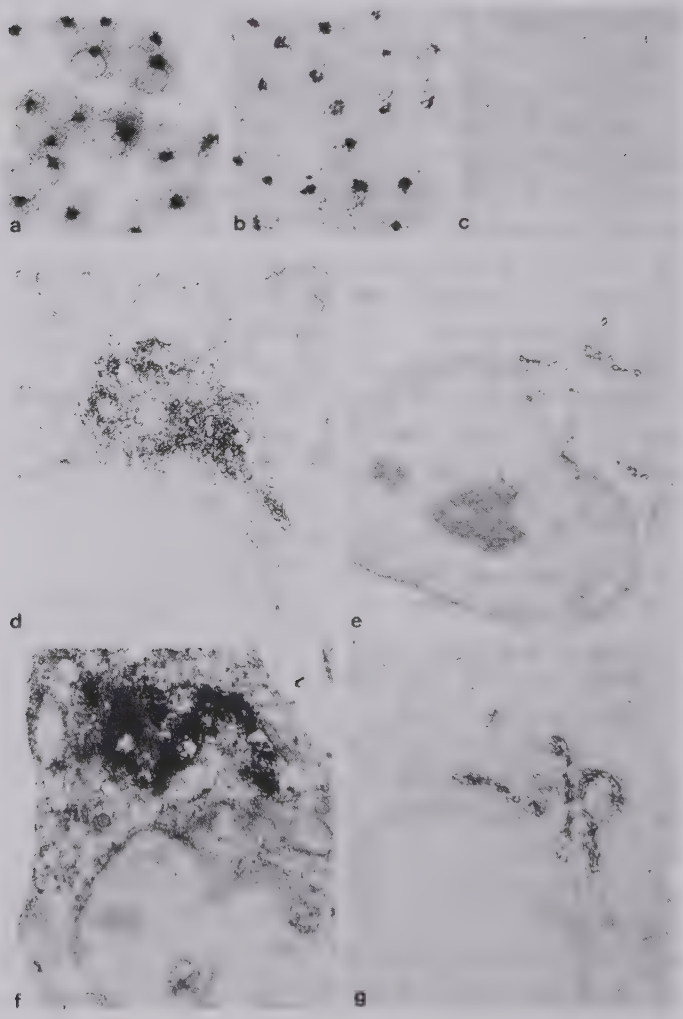
4.9.3. Immunelektronenmikroskopie

Um die Strukturen elektronenmikroskopisch zu identifizieren, an die sich die Golgi-Antikörper anlagern, wurden Immunperoxidase-Reaktionen mit polyklonalen Golgi-Antikörpern aus Seren LDV_{AGIA}-infizierter Tiere und mit verschiedenen Hybridomantikörpern durchgeführt. In Vorversuchen waren die Antikörper ausgewählt worden, die unter den gewählten Versuchsbedingungen (Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd, Permeabilisierung der Zellmembranen mit Saponin, Verwendung Peroxidase-gekoppelter Antikörper) lichtmikroskopisch eine deutliche Reaktion mit den Elementen des Golgi-Apparates zeigten. Für die Untersuchungen wurden XC- und NRK-Zellen verwendet. In Abb.10a-c sind die Reaktionen von Vollserum (a), dem monoklonalen Golgi-Antikörper F9/7-1-2 (b) und STU-Maus-Normalserum (c) auf XC-Zellen lichtmikroskopisch dargestellt. Sowohl das polyklonale Serum als auch der monoklonale Antikörper waren in der Lage, in der Immunperoxidasereaktion das typische Muster der kernnah gelegenen Strukturen des Golgi-Apparates anzuzeigen, während beim Normalserum keine Markierung zu sehen war.

Auf elektronenmikroskopischer Ebene erwies sich die in Anlehnung an Dunphy *et al.*, (1985) durchgeführte Methode als geeignet, die Antigenität der Golgi-Strukturen so zu erhalten, daß die Bindung von Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Die Verwendung von Diaminobenzidin als Peroxidase-Substrat ermöglichte eine gute Anlagerung von Osmium und sorgte damit für die erforderliche elektronendichte Markierung im Bereich der antigenen Strukturen. In Serienschnitten der eingebetteten Zellen konnte gezeigt werden, daß sowohl die polyklonalen als auch der monoklonale Golgi-Antikörper in der Lage waren, die Organelle spezifisch zu markieren (Abb.10d,e). Dabei konnte in allen Schnitten beobachtet werden, daß die poyklonalen Golgi-Antikörper aus dem Serum offenbar große Teile der Organelle erkennen (Abb.10d), während sich die Reaktion des monoklonalen Antikörpers auf distinkte Bereiche des Golgi-Apparates beschränkt (Abb.10e). Das eben beschriebene Reaktionsmuster bei XC-Zellen ließ sich auch bei NRK-Zellen zeigen (Abb.10f,g): Reaktion der poyklonalen Antikörper mit großen Teilen (f), Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit distinkten Bereichen des Golgi-Apparates (g). Noch

unbefriedigend nach dieser Methode erwies sich die Erhaltung der Feinstruktur der Zellen. Sie ließ eine Zuordnung der markierten Antigene zu bestimmten Kompartimenten der Organelle (cis, medial oder trans) bislang nicht zu.

Abb.10: Immunperoxidase-Reaktionen von Golgi-Antikörpern im Lichtmikroskop und im Elektronenmikroskop



Poly-und monoklonale Golgi-Antikörper wurden in Immunperoxidase-Reaktionen auf XC- und NRK-Zellen eingesetzt (s.3.13.3.)
a-c: Lichtmikroskopische Auswertung bei XC-Zellen: a: anti-Golgi-Serumpool, b: F9/7-1-2, c: STU-Normalserum
d-g: Immunelektronenmikroskopie: d: anti-Golgi-Serumpool auf XC-Zellen, e: F9/7-1-2 auf XC-Zellen, f: anti-Golgi-Serumpool auf NRK-Zellen, g: F9/7-1-2 auf NRK-Zellen

4.10. Produktion monoklonaler Virusantikörper

Neben der Gewinnung monoklonaler virusinduzierter Autoantikörper gegen zelluläre Strukturen war es von Interesse, Klone zu etablieren, die Antikörper gegen Virusantigene sezernieren. Solche Antikörper sollten einerseits dazu dienen, die antigenen Determinanten der Virusproteine zu charakterisieren und andererseits die Möglichkeit eröffnen, detaillierte Untersuchungen auf mögliche Kreuzantigenität zwischen Virus- und zellulärem Autoantigen durchzuführen.

Virusspezifische Antikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse:

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, der für eine Fusion zur Produktion monoklonaler Virusantikörper günstig ist, war es wichtig, zunächst die Entwicklung der Antikörperreaktion gegen das Virus zu untersuchen. Dazu wurde Serum von Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion gewonnen und in der indirekten Immunfluoreszenz auf fixierten, infizierten Makrophagen getestet.
Am Beispiel von 5 Mäusen ist in Tab.14 die Entwicklung der Antikörperreaktion gegen LDV_{AGIA} und der Verlauf der Autoimmunreaktion gegen Golgi-Antigen vergleichend dargestellt. Während die Golgi-Autoantikörper ab dem 6.-7. Tag p.i. nachweisbar waren und bis zum 26. Tag p.i. dominierten, wurden Virusantikörper erst ab dem 16. Tag im Serum erkennbar. In Seren, die 30 Tage p.i. gewonnen worden waren, zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine deutliche Reaktion mit Virusantigen in infizierten Makrophagen und 51 Tage p.i. dominierten die virusspezifischen Antikörper.

Tab.14: Anti-Golgi-Autoantikörper und virusspezifische Antikörper im Serum LDV_{AGIA}-infizierter STU-Mäuse

Maus-nr.	Antikörper-Spezifität[1]	Tage p.i.[2] 5	6	7	9	12	16	30	51
1	anti-Golgi	-	e[3]	+++[4]	+++	+++	+++	+	++
2		-	+	++	+++	+++	+++	++	+
3		-	-	e	+++	+++	+++	++	+
4		-	+	+++	+++	+++	+++	++	e
5		-	e	++	+++	+++	+++	++	+
1	anti-LDV	-	-	-	-	-	e	+	++
2		-	-	-	-	-	e	+	++
3		-	-	-	-	-	e	+	++
4		-	-	-	-	-	e	+	++
5		-	-	-	-	-	e	++	++

1) Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde in der indirekten Immunfluoreszenz an fixierten, infizierten Makrophagen bestimmt

2) Serum von STU_5-Mäusen wurde zu verschiedenen Zeiten nach LDV-Infektion ($10^{5,5}ID_{50}$/Maus) gewonnen und, 1:150 in PBS+2% Kaninchenserum verdünnt, in der Immunfluoreszenz eingesetzt

3) Reaktion schwach erkennbar

4) Intensität der beobachteten Fluoreszenz: schwach (+), mittel (++), stark (+++)

Screening von Virusantikörper-produzierenden Hybridomen:

Nach Etablierung eines Fluoreszenztests mit infizierten, fixierten Makrophagenkulturen auf Flow-Multitest-Objektträgern konnte parallel zum Screening auf Autoantikörper der Nachweis von Virusantikörpern in Überständen der Hybridomkulturen geführt werden. Dabei ließen sich unterschiedliche Reaktionsmuster bei infizierten Zellen beobachten (Abb.11):

1) Am weitaus häufigsten wurde eine diffus verteilte, aber kräftige Fluoreszenz im Bereich des gesamten Zytoplasmas beobachtet, oft kombiniert mit stark fluoreszierenden, kernnah gelegenen, strukturell sehr dichten Bereichen (Abb.11a).

2) Ein Hybridomantikörper zeigte eine Reaktion nur mit diesen dichten kernnahen Bereichen in infizierten Zellen (Abb.11b).

3) In einem Hybridomüberstand wurde nur eine schwache Plasmafluoreszenz, dafür aber Reaktion im gesamten Bereich des Kerns beobachtet (eventuell eine Kreuzreaktion zwischen Virus- und Kern-assoziiertem Antigen, da RNA-Viren nicht im Kern nachzuweisen sind) (Abb.11c).

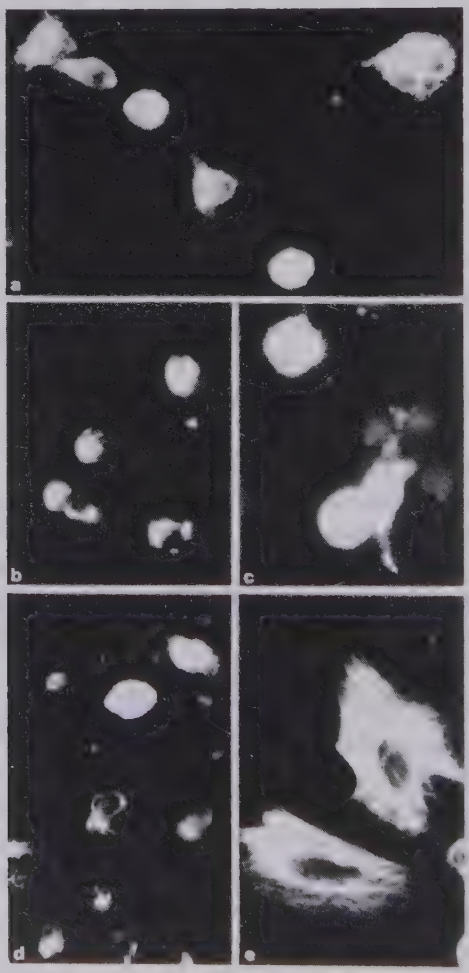
4) Ein weiteres Hybridom zeigte eine Doppelreaktion mit dem Plasma virusinfizierter Zellen und mit Zytoskelettelementen (Abb.11d), die auch bei der Untersuchung des Antikörpers auf unbehandelten, fixierten ML-Zellen (Abb.11e) deutlich zu erkennen waren.

Die Häufigkeit der virus-positiven Reaktionen in Kulturüberständen nach der Fusion ist in Tab.15 im Vergleich zu der Häufigkeit der Golgi-Antikörper dargestellt. Der Anteil an Virusantikörper-produzierenden Hybridomen zeigte dabei ein Maximum in der Fusion, die 31 Tage nach der Infektion durchgeführt worden war. Vor und nach diesem Zeitpunkt konnten nur wenige positive Kulturen nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß offensichtlich die Phase des Beginns der Immunantwort gegen das Virus (Tab.14) für eine Fusion am besten geeignet ist.Im Gegensatz dazu lag das Maximum der Golgi-Antikörper-produzierenden Kulturen, wie bereits gezeigt werden konnte (s.4.7.,Tab.9), 9-14 Tage nach der Infektion.

Kreuzreaktionen zwischen Virus- und Golgi-Antigenen waren in der Immunfluoreszenz nie zu beobachten. So reagierten Golgi-Antikörper auf infizierten Makrophagen nur mit Antigenen des Golgi-Apparates und Virusantikörper waren niemals in der Lage Golgi-Antigen auf

Schä-T-D- oder ML-Zellen zu erkennen.

Abb.11: Reaktionsmuster monoklonaler Virusantikörper auf infizierten Makrophagen und ML-Zellen



Monokonale Virusantikörper wurden in Form von Kulturüberstand oder Ascites-Flüssigkeit in der indirekten Immunfluoreszenz auf infizierten, fixierten Makrophagen (a-d) oder auf ML-Zellen (e) eingesetzt.
a: F21/2-1-2, b: F22/13-1-3, c: F13/1-1-3, d und e: F22/18-1-2

Tab.15: LDV-spezifische Antikörper in Hybridomüberständen

Fusion	d p.i.	Antikörper-produzierende Kulturen (%)[1] anti-LDV[2]	anti-Golgi[3]
B	4	0	3
G	14	4	37
H	21	7	15
I	31	16	7
K	59	1	1

1) Die Anzahl Antikörper-sezernierender Hybridome wurde durch Screening der Kulturüberstände 10-14 Tage nach der Fusion in der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt

2) Bestimmung auf infizierten, fixierten Makrophagen

3) Bestimmung auf fixierten Schä-T-D-Zellen

Klonierungen:

Klonierungen wurden in der beschriebenen Art (s.3.11.) durchgeführt. Bei der Klonierung positiver Ausgangskulturen lagen dabei die Ausbeuten bei etwa 10% Antikörper-produzierender Klone in Bezug auf die Anzahl der getesteten Klone. Nach der Subklonierung erwiesen sich 89% der Klone als stabil und standen damit für weitere Charakterisierungen zur Verfügung.

Subklassenverteilung der monoklonalen Virusantikörper:

Von den zur Charakterisierung der viralen Antigene eingesetzten monoklonalen Virusantikörpern wurde die Ig-Subklasse durch doppelte Immundiffusion (s.3.8.) in den Hybridomüberständen bestimmt. Sechs der 8 Antikörper gehörten der IgG_{2a}-Subklasse an (F13/1-4-1, F13/3-2-2, F13/7-1-2, F21/2-1-2, F22/13-1-3 und F22/18-1-2) neben einem IgM- (F22/10-1-2) und einem IgG_3-Antikörper (F22/13-2-2).

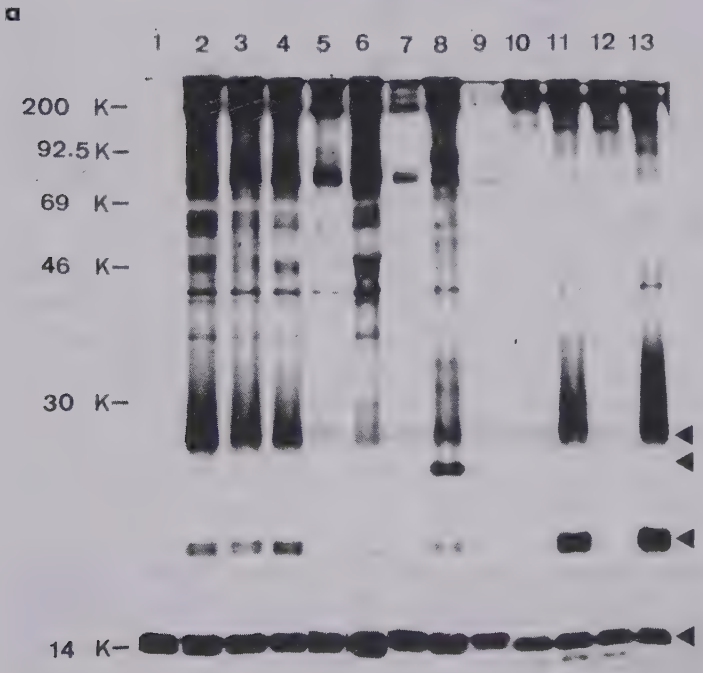
4.11. Charakterisierung der Virusantigene

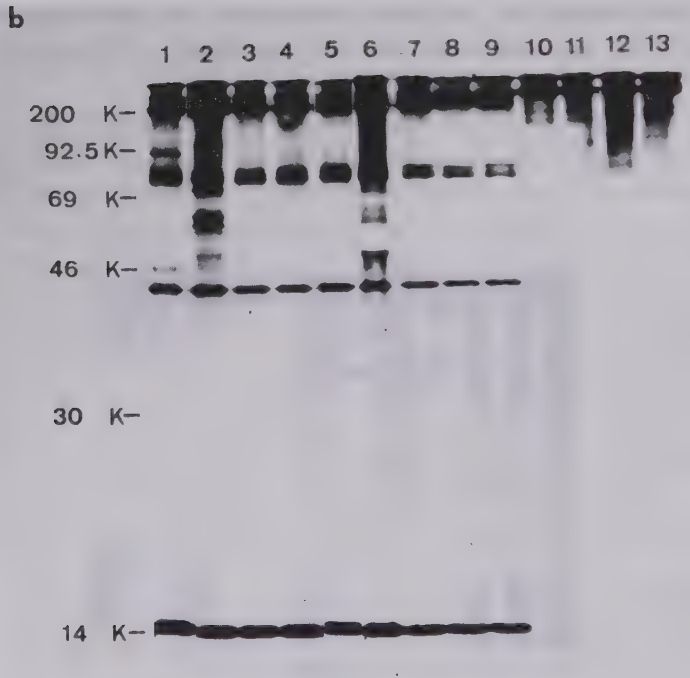
4.11.1. Radioimmunpräzipitation

Der Nachweis von Virusantigenen mit Hilfe der Radioimmunpräzipitation wurde im Lysat infizierter Makrophagen, die für 12 Stunden metabolisch markiert worden waren, und im Kulturüberstand dieser Zellen durchgeführt. (s.3.15.1). Dabei erwies sich die Markierung dichtgewachsener Zellen einer Minipetrischale mit 0,25mCi ^{35}S-Methionin und 0,25mCi ^{35}S-Cystein als ausreichend, um die Virusproteine deutlich nachweisen zu können, obwohl nur 0,1% der gesamten Radioaktivität eingebaut wurde und kein meßbarer Unterschied zwischen infizierten und nichtinfizierten Kulturen festzustellen war. Deutlicher dagegen waren die Unterschiede in den Kulturüberständen nach der Sedimentation des Virus und Aufnahme des Sediments in einem kleinen Volumen Triton-A. Hier lagen die Werte bei infizierten Zellen 2,5mal höher als bei nichtinfizierten.

Nach der Analyse der Präzipitate in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte sich, daß Virusproteine im Zellysat wie auch im Kulturüberstand deutlich markiert worden waren (Abb.12a). Auf dem Film waren Reaktionen mit allen drei Virusproteinen zu beobachten. Während der Antikörper F13/1-4-1 deutlich nur das VP1 mit einem Molekulargewicht von 14,5kD erkannte, ließen sich bei den anderen monoklonalen Virusantikörpern Reaktionen mit allen drei Virusproteinen beobachten. Allerdings wurde VP1 auch von Mäuse-Normalserum schwach präzipitiert, so daß eine echte Antigen-Antikörper-Reaktion bezweifelt werden muß. Die Reaktion mit VP3 zeigte das für dieses Protein typische Muster mit Molekulargewichten zwischen 28 und 44kD, was auf verschiedene Glykosylierungsstufen des Proteins zurückgeführt wird (Coutelier & van Snick, 1985). Der Anti-LDV$_{AGIA}$-Serumpool erkannte im Lysat infizierter Zellen zusätzlich ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 24kD, das im reifen Virion nicht mehr vorkommt, wie die Reaktion mit Virus aus dem Kulturüberstand zeigte. VP2 stellte sich im Gel als Bande in einem Bereich von 19kD dar.

Abb.12: Gelelektrophoretische Analyse nach Immunpräzipitation von Lysat metabolisch markierter infizierter bzw. nichtinfizierter Makrophagen-kulturen mit monoklonalen Virusantikörpern





Makrophagenkulturen wurden mit ^{35}S-Met und ^{35}S-Cys metabolisch markiert und *in vitro* infiziert (Abb.12a) bzw blieben unbehandelt (Abb.12b). Nach Präzipitation des Zellysats (1-9) bzw. des Zellkulturüberstandes (10-13) mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern erfolgte die Analyse auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen.
1: F13/1-4-1, 2: F13/7-1-2, 3: F21/2-1-2, 4 und 13: F21/2-3-2, 5: F13/3-2-2, 6: F13/18-1-2, 7 und 12: D56-1-X (Negativkontrolle: Antikörper mit anderer Spezifität), 8 und 11: anti-LDV-Serumpool, 9 und 10: STU-Normalserum

4.11.2. Immunoblotting

Voraussetzung für den Einsatz poly- und monoklonaler Virusantikörper in der Radioimmunpräzipitation war die radioaktive Markierung der Virusproteine. Da dies gezielt nur *in vitro* in infizierten Makrophagenkulturen durchgeführt werden konnte, war der Einsatz von Virusmaterial aus Serum, das eine wesentlich höhere Infektiosität besitzt als *in vitro* in infizierten Makrophagenkulturen erreicht werden kann (Weiland *et al.*, 1987), in diesem Testverfahren nicht möglich. Im Gegensatz dazu konnte im Immunoblottingverfahren Virus aus verschiedenen Quellen und in verschiedenen Präparationen eingesetzt werden.

a) Virus aus infizierten Makrophagenkulturen (Abb.13):

Im Vergleich zwischen infizierten und nichtinfizierten Zellen zeigte sich, daß es mit diesem Verfahren nur möglich war, ein bekanntes Virusprotein, VP3, darzustellen. Kein Antikörper war in der Lage, VP2 oder VP1 zu erkennen. Anti-LDV-Serum zeigte eine Reihe von Banden spezifisch auf infizierten Zellen: VP3 bei 30kD, die nicht glykosylierte Vorstufe des VP3 bei 26-28kD, die verschiedenen Glykosylierungsstufen des VP3 zwischen 30 und 44kD, sowie Reaktion mit einigen weiteren unbekannten Antigenen (45kD, 55-60kD und eine Doppelbande über 100kD). Mehrere monoklonale Virusantikörper erkannten ebenfalls VP3, keiner jedoch die nichtglykosylierte Vorstufe des Proteins und nur einige die verschiedenen Glykosylierungsstufen zwischen 30 und 44kD.

b)Virus aus Serum, über Saccharosegradienten und durch differentielle Zentrifugation gereinigt (Abb.14a):

Auch in hochgereinigten Viruspräparationen wurde von den eingesetzten Antikörpern nur das VP3 erkannt. Allerdings lag die Proteinkonzentration sehr niedrig, so daß lediglich beim Vollserum eine deutliche Reaktion sichtbar wurde. Die monoklonalen Antikörper zeigten nur eine schwache Markierung.

c) Virus aus Serum, unfraktioniert (Abb.14b):

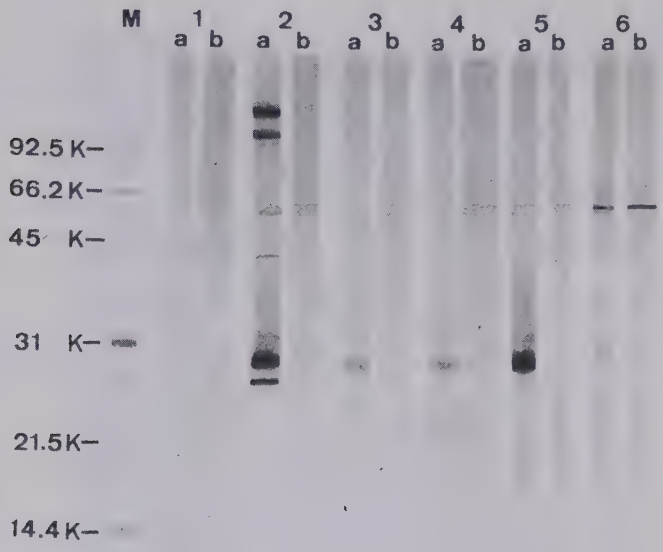
Mit dieser Präparation konnte kein Nachweis von Viruaantigenen geführt werden, da die vom Peroxidase-Konjugat erkannten leichten Immunglobulinketten virusspezifische Banden überdeckten. Lediglich bei Verwendung des anti-LDV-Serums waren die verschiedenen Glykosylierungsstufen des VP3 schwach zu erkennen. VP2 und VP1

konnten auch hier nicht nachgewiesen werden.

d)Virus aus dem Saccharosegradienten (Abb.15):

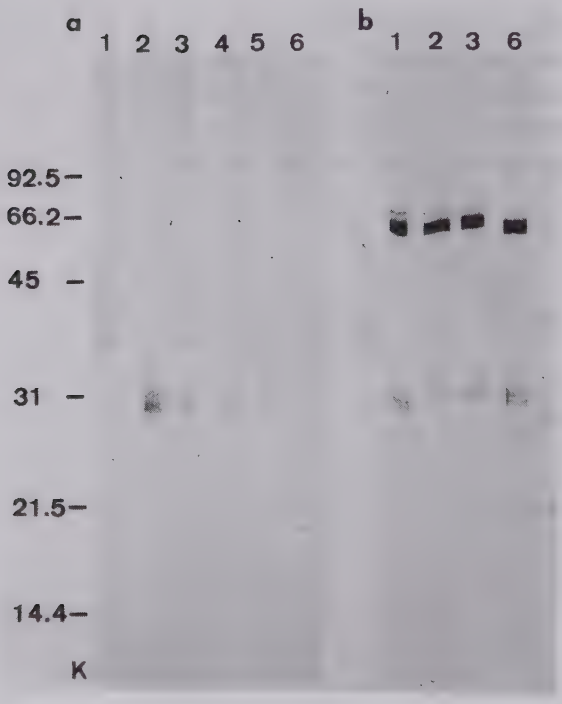
Ebenso wie bei unfraktioniertem Serum enthielt auch hier die Viruspräparation noch große Mengen an Immunglobulinketten aus dem Serum, so daß eine eindeutige Auswertung nicht möglich war. Allerdings schien die Virusproteinkonzentration gegenüber dem hochgereinigten Material deutlich höher zu liegen, so daß beim Antiserum und bei einigen monoklonalen Antikörpern die verschiedenen Glykosylierungsstufen des VP3 sichtbar wurden. Parallel zu den Virusantikörpern eingesetzte Golgi-Antikörper waren niemals in der Lage, Virusantigen spezifisch zu markieren.

Abb.13: Immunoblotting mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern nach gelelektrophoretischer Analyse des Lysats infizierter bzw. nichtinfizierter Makrophagen



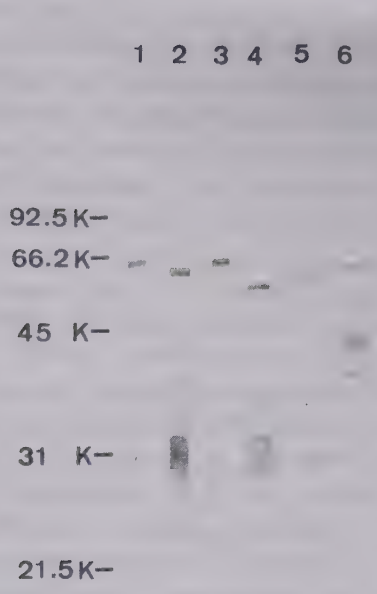
Infizierte bzw. nicht infizierte Makrophagenkulturen wurden mit Probenpuffer lysiert und auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranstreifen übertragen und mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern inkubiert.
a: Lysat infizierter Kulturen
b: Lysat nichtinfizierter Kulturen
1: STU-Normalserum, 2: anti-LDV-Serumpool, 3: F13/3-2-2, 4: F13/7-1-2, 5: F21/2-1-2, 6: F22/18-1-2

Abb. 14a und b: Immunoblotting mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern nach gelelektrophoretischer Analyse von hochgereinigtem LDV und von LDV-haltigem, unfraktioniertem Serum



Hochgereinigtes LDV (Abb.14a) und LDV-haltiges, unfraktioniertes Serum (Abb.14b) wurden auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose übertragen und mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern inkubiert.
1: STU-Normalserum, 2: anti-LDV-Serumpool, 3: F13/3-2-2, 4: F13/7-1-2, 5: F22/13-2-2, 6: F22/18-1-2

Abb.15: Immunoblotting mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern nach gelelektrophoretischer Analyse von LDV aus dem Saccharosegradienten



LDV aus dem Saccharosegradienten wurde auf einem 15%igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Immobilon-Membran übertragen und mit poly- und monoklonalen Virusantikörpern inkubiert.
1: STU-Normalserum, 2: anti-LDV-Serumpool, 3: F13/1-4-1, 4: F21/2-1-2, 5: F22/13-2-2, 6: F22/18-1-2

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Autoimmunantwort gegen Golgi-Antigene in STU-Mäusen nach Infektion mit dem Isolat "AGIA" des Laktatdehydrogenase-Virus (LDV_{AGIA}).

Durch Untersuchungen des Serums infizierter Tiere und vor allem durch die Produktion monoklonaler Autoantikörper gegen Golgi-Antigene und andere zelluläre Antigene konnten Autoantikörper und Autoantigene detaillierter beschrieben und charakterisiert werden.

Durch die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen virale Antigene wurde die Voraussetzung für Untersuchungen über die mögliche Kreuzantigenität zwischen Virus- und Autoantigenen geschaffen.

Infektion mit LDV_{AGIA}:

Wie Weiland et al. (1987) gezeigt haben, besitzt der zunächst als "AGIA" (anti-Golgi inducing agent; Weiland & Weiland, 1985) bezeichnete Autoantikörper-induzierende Erreger alle Eigenschaften, die etablierte LDV-Stämme auszeichnen. In Übereinstimmung mit den bekannten Daten konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, daß LDV_{AGIA} morphologisch anderen LDV-Isolaten gleicht: sphärische, umhüllte Partikeln wie sie von Brinton-Darnell & Plagemann (1975) und Horzinek *et al.* (1975) beschrieben wurden, konnten in gereinigten Viruspräparationen und in Ultradünnschnitten infizierter Makrophagen beobachtet werden. In infizierten Zellen konnte das Auftreten von Doppelmembranvesikeln (Rowson & Mahy, 1985) auch nach LDV_{AGIA}-Infektion elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (s.Abb.1). Das Auftreten dieser Doppelmembranvesikel in infizierten Makrophagen ist eine Antwort auf die Virusinfektion, doch vermutlich keine LDV-spezifische, da solche Veränderungen auch nach Infektion mit Maus-Hepatitis-Virus in diesem Zelltyp beobachtet werden können (Stueckemann *et al.*, 1982b).

Es wurde gezeigt, daß die Fähigkeit von LDV_{AGIA}, sich in murinen Makrophagen zu replizieren (Brinton-Darnell *et al.*, 1975), auf eine Subpopulation dieser Zellen beschränkt ist. Nach Infektion von Mäusen *in vivo* und anschließender Isolierung der Peritonealzellen konnten in der indirekten Immunfluoreszenz nur sehr wenige

infizierte Zellen beobachtet werden (s.Abb.2). Infektionen von Makrophagenkulturen *in vitro* führten auch bei Anwendung sehr hoher Erregerdosen (20 infektiöse Einheiten/Zelle) nur bei etwa 10% der Zellen zu einem Infektionserfolg. Ein ähnlicher Prozentsatz von 10 - 15% Zellen wird auch von anderen Autoren beschrieben (Tong *et al.*, 1977; Stueckemann *et al.*, 1982a). Die Subpopulation permissiver Zellen ist nach Inada & Mims (1984; 1985) charakterisiert durch Expression des Ia-Antigens auf der Zelloberfläche, das nach Meinung der Autoren den LDV-Rezeptor darstellt. Andere Studien unter Verwendung phänotypisch gemischter Viruspartikeln aus Sindbis-Virus-RNA und LDV-Hüllprotein, mit denen Infektion von Hühner-Embryonal-Fibroblasten gelang (Lagwinska *et al.*, 1975), legen den Schluß nahe, daß nicht der Mangel an geeigneten Rezeptoren auf anderen Zellen als bestimmten murinen Makrophagen für das enge Wirtszellspektrum von LDV verantwortlich ist, sondern ein Block der Virusreplikation nach der Adsorption und Penetration.

Der Anteil *in vitro* infizierter Makrophagen zeigt ein Maximum etwa 12 Stunden nach der Infektion, danach geht er rasch zurück, und 48 Stunden nach der Infektion sind nur noch vereinzelt mit Virusantikörpern reagierende Zellen zu beobachten. Dies ist auf eine Zerstörung der LDV-permissiven Zellen zurückzuführen (Stueckemann *et al.*, 1982b), die *in vivo* kontinuierlich aus nicht permissiven Vorläuferzellen hervorgehen (Stueckemann *et al.*, 1982a).

Der Nachweis einer LDV-Infektion in vivo war bisher nur durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase(LDH)-Aktivität, die nach der Infektion drastisch erhöht ist, möglich (Rowson & Mahy, 1985). Diese Erhöhung der Enzymaktivität wird einem verminderten metabolischen Abbau des Enzyms im Serum zugeschrieben (Rowson & Mahy, 1975), für den die Subpopulation der zerstörten Makrophagen zuständig sein könnte.

Nachdem die Autoantikörper-induzierende Eigenschaft von LDV bekannt war (Weiland *et al.*, 1987), konnte ein Bioassay etabliert werden, der eine Infektion mit bislang drei getesteten LDV-Stämmen durch den Nachweis von zwei Autoantikörpergruppen sicher anzeigt: a) Autoantikörper gegen Golgi-Antigene und b) Autoantikörper gegen ein Oberflächenantigen bestimmter Tumorzellen. Beide Autoanti-

körpergruppen traten regelmäßig und unabhängig von der Virusdosis im Serum infizierter Tiere auf und konnten innerhalb der ersten Woche nach der Infektion nachgewiesen werden. Daß der Nachweis der Autoantikörper zu diesem Zeitpunkt auch nach Infektion mit sehr geringen Virusdosen möglich ist, beruht wahrscheinlich auf der sehr raschen Vermehrung dieses Virus (Rowson & Mahy, 1985). Ein Vergleich mit den LDH-Werten (s.Tab.1) zeigte die Zuverlässigkeit der Autoantikörperbestimmung. Gegenüber der LDH-Bestimmung hatte der Bioassay den Vorteil, daß der Nachweis der Infektion auch in hämolytischen Serumproben durchgeführt werden konnte.

Neben der Erhöhung der LDH-Aktivität im Serum wird ein starker Anstieg der Immunglobulinkonzentration nach LDV-Infektion beschrieben (Notkins *et al.*, 1966). Eigene Messungen der Konzentration in LDV_{AGIA}-infizierten STU-Mäusen ergaben, daß die IgG-Konzentration bis zum 10-fachen des Normalwerts erhöht sein kann und daß auch ein Anstieg der IgM-Konzentration um den Faktor 5 zu beobachten ist (s.Tab.3 und 4).

Nach Michaelidis & Simms (1977a) und Coutelier & van Snick (1985) betrifft diese Erhöhung vor allem die IgG_{2a}-Subklasse und in einem geringeren Maß auch die IgG_{2b}-Subklasse. Die Spezifität dieser Antikörper war nicht bekannt. Zwar konnte gezeigt werden, daß antivirale Antikörper einen Anteil der im Serum vermehrten Immunglobuline darstellen (McDonald *et al.*, 1983; Cafruny & Plagemann, 1982a), überwiegend wurde jedoch der Anstieg der Immunglobulin-Konzentration als Folge einer polyklonalen B-Zell-Stimulierung durch das Virus betrachtet. Diese Vorstellungen werden gestützt durch Befunde von Coutelier & van Snick (1985), die in einer Reihe von Fusionen mit Milzzellen LDV-infizierter Tiere nur wenige Hybridomkulturen erhielten, die Virusantikörper produzierten, aber viele, die IgG_{2a} mit unbekannter Spezifität sezernierten. Durch die erstmalige Beschreibung der Eigenschaft von LDV, die Bildung von Autoantikörpern zu induzieren (Weiland *et al.*, 1987), konnten weitere Untersuchungen über die Spezifität der LDV-induzierten Immunglobuline durchgeführt werden und es war möglich zu zeigen, daß LDV-Infektion die regelmäßige Entwicklung von Autoantikörpern gegen Golgi-Antigene bewirkt (s.Tab.5). Es konnte darüberhinaus nachgewiesen werden, daß die anti-Golgi-Autoantikörper in den Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b} dominieren, so

daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Autoantikörper zumindest für einen Teil der IgG-Erhöhung in LDV-infizierten Tieren verantwortlich sind (s.Tab.8a). Gegenwärtig ist noch wenig über den Mechanismus bekannt, der der Determinierung von Ig-Subklassen zugrunde liegt. So ist vorstellbar, daß bestimmte Helferfaktoren Ig-Klassen-spezifisch sind, also nur an solch B-Zellen binden und sie aktivieren, die Rezeptoren der gleichen Ig-Klasse oder -Subklasse besitzen. Nach Rubin *et al.* (1986) scheint die Art der Autoantigene bei der Determinierung der Antikörper-subklasse eine Rolle zu spielen. Isolierung der für die Golgi-Autoantikörper verantwortlichen Autoantigene und Analyse der durch sie aktivierbaren B-Zellen könnte zum Verständnis der B-Zell-Aktivierung und des Ig-"switch"-Mechanismus beitragen. Das LDV_{AGIA}-Modell ist darüberhinaus von besonderer Bedeutung, da die Autoantikörper-Produktion in immunkompetenten adulten Mäusen induzierbar ist, während andere Virusarten, die Autoantikörper induzieren können, wie das Reovirus (Onodera *et al.*, 1981; Haspel *et al.*, 1983) und das Coxsackie-Virus B_3 (Wolfram *et al.*, 1985; Neu *et al.*, 1987) nur immuninkompetente Saugmäuse nach Infektion zur Bildung von Autoantikörpern veranlassen.

Neben der Induktion der bisher beschriebenen Autoantikörper-gruppen (Autoantikörper gegen Golgi-Antigene und Autoantikörper gegen ein Oberflächenantigen bestimmter Tumorzellen), die immer mit der LDV_{AGIA}-Infektion korreliert und in der ersten Woche nach der Infektion nachweisbar sind, können bei der Verwendung von Nerzlungenzellen (ML) als Targetzellen in der indirekten Immun-fluoreszenz noch weitere Autoantikörperreaktionen beobachtet werden: gegen Anteile des Zytoskeletts (Intermediärfilamente, Mikrofilamente), gegen Mitochondrien- und gegen Kern-assoziierte Antigene (s.Abb.4). Während Antikörper gegen Antigene des Zyto-skeletts bei der Mehrzahl LDV_{AGIA}-infizierter Tiere etwa vier Wochen nach der Infektion nachweisbar sind, sind Antikörper gegen Mitochondrien- und Kern-assoziierte Antigene nur unregelmäßig zu finden. Diese Autoantikörper sind daher im Gegensatz zu den Golgi-Autoantikörpern zum Nachweis einer LDV-Infektion nicht geeignet. Bei der Untersuchung des Reaktionsspektrums polyklonaler Golgi-Antikörper zeigte sich, daß die damit reagierenden Antigene stark konserviert waren und sich in Kulturzellen von drei Vertebraten-

klassen nachweisen ließen (Weiland *et al.*, 1984). Die in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesenen Autoantikörpertiter lagen, unabhängig von der Infektionsdosis, relativ hoch (bis 2400, s.Tab.6 und 7) im Vergleich zu Herz-spezifischen Antikörpern nach Coxsackie B_3-Infektion (Wolfgram *et al.*, 1985), die im gleichen Nachweisverfahren Titer zwischen 15 und 85 aufwiesen.

Die Spezifität der Autoantikörper in anderen Virus-Maus-Modellen ist oft nur an einzelnen Organen der infizierten Mäuse untersucht. So beschreiben Wolfgram *et al.* (1985) die von ihnen gefundenen Autoantikörper als herzspezifisch und Neu *et al. (1987)* können zeigen, daß solche Antikörper gegen Myosin des Herzmuskels gerichtet sind. Onodera *et al.* (1981) finden nach Reovirusinfektion im Serum der Mäuse Antikörper gegen cytoplasmatische Antigene in Langerhansschen Inseln, in der vorderen Hypophyse und in der Magenschleimhaut. Sie konnten zeigen, daß einige Autoantikörper gegen Insulin bzw. Wachstumshormon gerichtet sind. Darüberhinaus wurden auch Autoantikörper beschrieben, die Oberflächenantigene von Inselzellen, Thymozyten und Wachstumshormon-produzierenden Zellen erkennen (Onodera *et al.*, 1982).

Produktion monoklonaler Autoantikörper:

Eine detailliertere Analyse der Autoimmunantwort und Charakterisierung der Autoantigene ist durch Gewinnung und Anwendung monoklonaler Autoantikörper möglich.

Aus 12 erfolgreichen Fusionen mit Milzzellen LDV-infizierter Mäuse wurden in dieser Studie zahlreiche Hybridome etabliert, die stabil Autoantikörper produzieren. Ein Großteil sezerniert Antikörper gegen Golgi-Antigene, daneben wurden auch Hybridome etabliert, die Autoantikörper gegen Zytoskelett, Mitochondrien- und Kern-assoziierte Antigene produzieren.

Das Maximum an Golgi-Antikörper-produzierenden Hybridomkulturen (41 bzw. 37%) konnte in Fusionen erzielt werden, die 9-14 Tage nach Infektion der Tiere durchgeführt worden waren (s.Tab.9). Das bedeutet, daß der Beginn des Anstiegs des Golgi-Antikörper-Titers im Serum den günstigsten Zeitpunkt für die Fusion darstellt, während im Serum das Maximum der Golgi-Antikörpertiter zwischen 14 und 28 Tagen p. i. liegt.

Kloniert wurden solche Hybridome, die eine deutliche Reaktion mit Golgi-Antigen in der indirekten Immunfluoreszenz zeigten. Parallel dazu wurden die unklonierten Hybridomkulturen weiter kultiviert und auf ihre Autoantikörperproduktion getestet. Dabei konnte bei einem Teil der Kulturen beobachtet werden, daß nach einigen Tagen keine Antikörper mehr im Überstand nachweisbar waren. Die Ursache dafür könnte in einem Überwachsen der Golgi-Antikörper-sezernierenden Zellen durch andere Hybridome zu suchen sein, nachdem die Golgi-Antikörper-produzierenden Zellen, die die Antikörper über ihren eigenen Golgi-Apparat prozessieren und transportieren, je nach Lokalisation der antigenen Determinanten in der Organelle, einen Selektionsnachteil besitzen.

Die Hybridomkulturen, die stabil Golgi-Antikörper produzierten, konnten zu 50% erfolgreich kloniert werden (s.Tab.10). Zur Produktion größerer Mengen an Antikörpern wurde der Weg über die Ascites-Induktion in Mäusen gewählt, da die Antikörper-Konzentration um den Faktor 10^2 bis 10^3 höher liegt als in Kulturüberständen (Nowinski *et al.*, 1979; Oxford, 1982). Dabei wurde häufig beobachtet, daß die Mäuse schon früh nach dem Transfer der Zellen starben, ohne daß sich eine größere Menge Ascites-Flüssigkeit gebildet hatte.

Die Verteilung der Subklassen der monoklonalen Golgi-Antikörper entsprach der im Serum beobachteten. Bis auf drei IgM-Antikörper waren alle Golgi-Antikörper in den Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b} zu finden (s.Tab.12).

Auch andere Autoren sind diesen Weg über die Produktion monoklonaler Autoantikörper gegangen, um eine genauere Analyse einer virusinduzierten Autoimmunantwort zu erhalten. So finden Haspel *et al.* (1983b) monoklonale Autoantikörper nach Reovirus-Infektion, die sich gegen Antigene in Hypophyse, Pankreas, Dünndarm und Magen richten. Sie beschrieben auch Antikörper (Haspel *et al.*, 1983a), die meist organspezifisch reagieren und manche Autoantikörper zeigen ein breites Reaktionsspektrum bei verschieden Tierspezies. Sie konnten zeigen, daß Antikörper gegen cytoplasmatische Antigene verschiedene Hormone erkennen (Glucagon, Wachstumshormon, Insulin). Tardieu *et al.* (1984) konnten ebenfalls im Reovirussystem monoklonale Autoantikörper etablieren, die gegen verschiedene Gewebe mit unterschiedlichem Reaktionsmuster gerich-

tet sind. So finden sie Autoantikörper, die spezifisch gegen das Gewebe eines bestimmten Organs gerichtet sind, neben Antikörpern, die kreuzreagieren können. Die Analyse der Antikörperreaktion an isolierten Zellen zeigt die Beteiligung von Oberflächenantigenen als Autoantigenen. Nach Immunisierung von Mäusen mit infektiösem oder inaktivierten Vaccinia-Virus finden Dales *et al.* (1983) zahlreiche Hybridome, die Antikörper gegen Antigene des Zytoskeletts, insbesondere Intermediärfilamente, produzieren.

Probleme, die sich bei der Produktion von monoklonalen Autoantikörpern gegen zelluläre Strukturen stellen, ergeben sich aus der Tatsache, daß die Antikörper-produzierende murine Hybridomzelle diese Autoantigene selbst besitzt. Das wird speziell bei der Produktion von anti-Golgi-Autoantikörpern deutlich, da die Antikörper als sekretorische Proteine den Golgi-Apparat passieren müssen. Diese Tatsache führte zu der Annahme, daß eine Produktion monoklonaler Antikörper gegen Maus-Golgi-Antigene im murinen System schwer vorstellbar sei (Burke *et al.*, 1982). Wie die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, konnten in Fusionsexperimenten nach LDV-Infektion zahlreiche Golgi-Antikörper-produzierende Hybridome beobachtet werden (bis zu 41% der getesteten Hybridome), die durch Targetzellen muriner Herkunft nachweisbar waren. Wurden einige der monoklonalen Golgi-Antikörper auf fixierten Myelomzellen, die für die Fusionen verwendet worden waren, in der indirekten Immunfluoreszenz getestet, so zeigte sich eine deutliche Reaktion mit Elementen des Golgi-Apparates. Die erfolgreiche Etablierung von monoklonalen Golgi-Antikörpern gegen murine Golgi-Antigene hängt möglicherweise von der Orientierung der antigenen Determinanten in der Golgi-Organelle ab. Man kann sich vorstellen, daß die LDV_{AGIA}-induzierten monoklonalen Golgi-Antikörper mit Bestandteilen der Organelle reagieren, die nicht zum Lumen gerichtet sind, das die Antikörper als sekretorische Produkte passieren.

Spezifität der Autoantikörper:

Die Spezifität der durch die Autoantikörper markierten zellulären Antigene konnte durch Behandlung der Kulturzellen mit solchen Reagenzien, die die Morphologie subzellulärer Strukturen in charakteristischer Weise veränderten, bzw. durch Anwendung von Spezialfärbungen nachgewiesen werden.

So konnten die von LDV_{AGIA}-induzierten Golgi-Antikörpern erkannten antigenen Strukturen durch Behandlung von Schä-T-D-Zellen mit Monensin, einem Ionophor, aufgelöst werden (s.Abb.2). Dieses Verhalten nach Monensinbehandlung wird zur Identifizierung des Golgi-Apparates mehrfach beschrieben (Lin *et al.*, 1982; Louvard *et al.*, 1982; Hiller & Weber, 1982; Smith *et al.*, 1984; Weiland *et al.*,1984; Allen & Kreis, 1986). Außerdem konnte durch die monoklonalen LDV-induzierten Golgi-Antikörper gezeigt werden, daß die damit reagierenden antigenen Strukturen während der Mitose aufgelöst werden und sich in der Telophase wieder rekonstituieren (s.Abb.3). Dieses Reaktionsmuster von Golgi-assoziierten Antigenen wurde zuvor von zwei anderen, durch Antikörper definierten Antigenen gezeigt: der Galaktosyltransferase (Hiller & Weber, 1982)und einem biochemisch nicht bekannten 135kD-Antigen (Burke *et al.*, 1982).

Antikörper gegen Elemente des Zytoskeletts zeigten zwei verschiedene Reaktionsmuster: gegen Intermediärfilamente und gegen Mikrofilamente. Der Nachweis der erkannten Antigene konnte geführt werden durch Reaktion mit Colcemid- bzw. Cytochalasin-B-vorbehandelten ML-Zellen (s.Abb.4). Während nach Colcemidbehandlung die Intermediärfilamente zu kernnah orientierten Schlingen kollabiert waren (Franke *et al.*, 1978), wurden durch Cytochalasin-B-Behandlung die Mikrofilamente aufgelöst (Couble *et al.*, 1984).

Antikörper gegen Mitochondrien-assoziierte Antigene ließen sich identifizieren durch Vergleich mit dem Reaktionsmuster eines Vitalfarbstoffes für Mitochondrien, Rhodamin 123 (Johnson *et al.*, 1981) und Antikörper gegen Kern-assoziierte Antigene wurden durch Vergleich mit Hoechst 33.258-gefärbten Zellkernen erkannt (s.Abb.4).

Reaktionsspektrum der monoklonalen Autoantikörper:

Wie schon mit polyklonalem Antiserum gezeigt werden konnte (Weiland *et al.*, 1984), reagieren die LDV-induzierten Golgi-Autoantikörper mit Golgi-Antigenen in einer Vielzahl von Zellen aus 3 Vertebratenklassen. Daß auch monoklonale Autoantikörper ein breites Reaktionsspektrum zeigen, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (s.Tab.13). Einige zeigten breite Kreuzreaktivität und reagierten mit antigenen Determinanten in der Golgi-Region von Säuger-, Geflügel- und Fischzellen, einige reagierten nur mit Golgi-Antigen in Säugerzellen und ein Antikörper markierte den Golgi-Apparat nur in der für das Screening nach der Fusion verwendeten murinen Targetzelle. Diese unterschiedlichen Reaktionsmuster weisen darauf hin, daß eine Vielzahl von autoantigenen Determinanten erkannt wird, die unterschiedlich stark konserviert sind. Durch das breite Reaktionsspektrum einiger monoklonaler Golgi-Antikörper ist es damit möglich, Golgi-Antigene mit ein und demselben Antikörper in einer Vielzahl von Zellen vergleichend zu untersuchen. Alle bisher beschriebenen Golgi-Antikörper, die durch konventionelle Immunisierung von Mäusen mit Zellysaten, Mikrosomenfraktionen oder gereinigten Golgi-Enzymen erhalten wurden, haben ein enges Reaktionsspektrum. So reagiert ein Antikörper gegen ein bio-chemisch nicht näher charakterisiertes 135kD-Membranprotein des Golgi-Apparates nur mit den cis-Zisternen in bestimmten Nagerzellen (Louvard *et al.*, 1982; Burke *et al.*, 1982). Ein monoklonaler Antikörper von Dunphy *et al.* (1985) gegen einen medialen Golgi-Marker, N-Acetylglucosamintransferase, reagiert nur mit Kaninchenzellen und polyklonale Antikörper gegen Galaktosyltransferase, einem trans-Golgi-Marker, reagieren zwar mit Menschen-, Affen-, Rinder- und Hunde-, nicht aber mit Nager- oder Vogel-Zellen (Hiller & Weber, 1982; Roth und Berger,1982). Es war deshalb bisher nicht möglich, den Golgi-Apparat in einer Vielzahl von Zellen mit einem Antikörper vergleichend zu untersuchen.

Radioimmunpräzipitation und Immunoblotting:

Zur Charakterisierung der Autoantigene wurden Golgi-Antikörper in der Radioimmunpräzipitation und im Immunoblottingverfahren eingesetzt (s.Abb.5-9). In beiden Verfahren gelang die spezifische Präzipitation bzw. Markierung von Antigenen. Höhermolekulare Antigene konnten besser in der Immunpräzipitation nach Analyse auf Gradientengelen nachgewiesen werden, während niedermolekulare deutlicher im Immunoblotting zu sehen waren. Nur ein Antigen (96kD) war in beiden Verfahren zu erkennen. Spezifisch präzipitiert wurden 4 Antigene mit den Molekulargewichten > 300kD, 145kD, 96kD und 80 kD, im Immunoblotting wurden ebenfalls 4 Antigene mit den Molekulargewichten 95kD, 58kD, 43kD und 36kD markiert. Golgi-Antigene mit derartigen Molekulargewichten wurden bislang nicht beschrieben. Smith *et al.*(1984) finden nach Analyse von zwei monoklonalen Golgi-Antikörpern zwei Antigene mit 103-108kD und 180kD im Immunoblot. Chicheportiche *et al.* (1984) weisen nach Immunisierung mit einer Galaktosyltransferase-reichen Mikrosomenfraktion mit einem monoklonalen Antikörper zwei Antigene mit 54kD und 86kD durch Immunoblotting nach. Ein monospezifisches Anti-Golgi-Kaninchenserum (Louvard *et al.*, 1982) und ein monoklonaler Golgi-Antikörper (Burke *et al.*, 1982) erkennen in der Radioimmunpräzipitazion ein 135kD-Protein, Lin & Queally (1982) konnten mit derselben Methode ein Antigen mit 110kD präzipitieren und Nigg *et al.* (1985) finden nach Immunisierung mit einer cAMP-abhängigen Protein-Kinase III Golgi-Antikörper, die zwei Antigene mit 56 und 52kD im Immunoblot markieren.

Erst ein direkter Vergleich der verschiedenen Antikörper im selben Versuchsansatz könnte Aufschlüsse geben, ob einige Antigene mit den hier beschriebenen verwandt oder identisch sind.

Immunelektronenmikroskopie:

Mit den in der Immunelektronenmikroskopie eingesetzten poly- und monoklonalen Golgi-Antikörpern konnte der Golgi-Apparat in XC- und NRK-Zellen spezifisch markiert werden (s.Abb.10). Dabei waren Unterschiede in der Markierung zwischen poly- und monoklonalen Antikörpern bei beiden Zellen zu beobachten. Während die polyklonalen Antikörper die Organelle in weiten Teilen markierte, reagierte der monoklonale Antikörper nur mit distinkten Bereichen

des Golgi-Apparates.

Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen am Golgi-Apparat dienten meist der genauen Lokalisierung von Enzymen innerhalb der Organelle (Cis, medial, trans). So konnten Roth & Berger (1982) mit Antikörpern gegen Galaktosyltransferase trans-Zisternen des Golgi-Apparates markieren, während Chicheportiche *et al.* (1984) mit einem, nach Immunisierung mit einer Galaktosyltransferase-reichen Mikrosomenfraktion erhaltenen, monoklonalen Golgi-Antikörper mediale Bereiche der Organelle als antigene Struktur identifizierten. Im selben Bereich lokalisierten Dunphy *et al.* (1985) das Enzym N-Acetylglukosamintransferase. Roth *et al.* (1985) konnten mit Antikörpern gegen Sialyltransferase das Enzym im trans-Bereich der Organelle markieren, wo Orci *et al.* (1985) auch Clathrin nachgewiesen haben.

Die Zuordnung der durch LDV-induzierte Antikörper erkannten Golgi-Antigene zu bestimmten Kompartimenten des Golgi-Apparates war bisher noch nicht möglich und bleibt weiteren Studien mit modifizierten Methoden vorbehalten.

Monoklonale Virusantikörper:

Neben der Produktion monoklonaler Autoantikörper gegen Golgi- und andere zelluläre Antigene wurden Hybridome etabliert, die stabil Virusantikörper produzierten. Damit sollte die Voraussetzung geschaffen werden für Untersuchungen, die Fragen nach der Kreuzantigenität von zellulärem und viralem Antigen beantworten können, da zu den gängigen Vorstellungen über die Induktion virusinduzierter Autoimmunität gehört, daß die Erreger über antigene Determinanten verfügen, die mit Autoantigenen kreuzreagieren und das Immunsystem im Zuge einer Abwehr der Erreger autoreaktive Antikörper produziert.

Da nach den Erfahrungen anderer Autoren der Anteil Virusantikörper-produzierender Hybridome nach Fusion von Milzzellen LDV-infizierter Tiere unter einem Prozent lag (Coutelier & van Snick, 1985; Harty *et al.*, 1987), wurde in der vorliegenden Arbeit durch Fusionen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion der günstigste Zeitpunkt für die Produktion von Virusantikörpern bestimmt. Nach Befunden bei Serumuntersuchungen infizierter Tiere waren Virusantikörper erst ab dem 16. Tag nachweisbar und dominierten etwa ab

dem 50. Tag nach der Infektion (s.Tab.14). In den durchgeführten Fusionen lag der günstigste Zeitpunkt für die Produktion von monoklonalen Virusantikörpern etwa 30 Tage nach der Infektion, ein Zeitpunkt, der in der Anfangsphase der Immunantwort gegen das Virus liegt. Der Anteil virusantikörper-positiver Hybridome lag hier bei 16%. Die geringe Ausbeute an Virusantikörper-produzierenden Hybridomen bei Harty *et al.* (1987) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Fusionen 6 Tage nach der Infektion der Tiere durchgeführt wurden, ein Zeitpunkt, zu dem in den eigenen Versuchen keine Virusantikörper- produzierenden Hybridomkulturen nachgewiesen werden konnten. Die geringe Ausbeute von Coutelier & van Snick (1985) könnte ihre Ursache in der Verwendung anderer Mäusestämme, eines anderen LDV-Isolats und des ELISA als Screening-Verfahren haben.

Das Reaktionsmuster der Hybridomantikörper auf infizierten Makrophagen (s.Abb.11) wies das von den Serumbefunden her bekannte Bild auf: Eine diffuse, aber deutliche Plasmafluoreszenz bei etwa 10% der Zellen zeigte eine Virusantikörper-positive Reaktion an. Danneben konnten in infizierten Zellen kräftig fluoreszierende kernnahe Strukturen beobachtet werden, und in einer Fusion konnte auch ein Hybridom gefunden werden, das nur mit diesen Bereichen infizierter Zellen reagierte. Außerdem konnte ein Hybridom erfolgreich kloniert werden, das antivirale Antikörper produziert, die eine Kreuzreaktion mit Anteilen des Zytoskeletts zeigen. Monoklonale Antikörper, die mit Virus- und Zytoskelettantigen kreuzreagieren wurden auch nach Infektion mit anderen Virusarten beobachtet. So erhielten Fujinami *et al.* (1983) nach Infektion mit Masernvirus monokonale Antikörper, die Kreuzreaktionen mit einem viralen Phosphoprotein und Intermediärfilamenten menschlicher Zellen zeigten und Gould *et al.* (1983) beschrieben monoklonale Antikörper gegen das Japanische Enzephalitis Virus, die mit einem nukleären Antigen in Säugerzellen reagierten.

Erstmals wurden in der vorliegenden Arbeit monoklonale LDV-spezifische Virusantikörper in der Radioimmunpräzipitation eingesetzt (s.Abb.12). Dabei konnten alle drei beschriebenen Virusproteine aus Lysaten infizierter und radioaktiv markierter Makrophagen präzipitiert werden. Die meisten Antikörper erkannten neben VP3 auch das VP2, was möglicherweise auf eine Kopräzipi-

tation der beiden Antigene oder auf eine Kreuzantigenität zwischen beiden Virusproteinen hindeutet. Präzipitation des VP1, dem Protein des Nukleokapsids, wurde deutlich bei einem monoklonalen Antikörper beobachtet, der VP2 und VP3 nicht erkannte. Allerdings ist fraglich, ob Antikörperreaktionen mit VP1 überhaupt spezifisch sind, da auch STU-Normalserum eine schwache Reaktion im Bereich dieses Virusproteins zeigte. Der anti-LDV-Serumpool präzipitierte ein zusätzliches Protein mit einem Molekulargewicht von 24kD, möglicherweise eine (nicht glykosylierte) Vorstufe des VP3, da diese Bande nur nach Präzipitation aus dem Lysat der infizierten Makrophagen nachzuweisen war, nicht jedoch aus dem Kulturüberstand, der die kompletten Virionen enthält.

Im Immunoblotting (s.Abb.13-15) war ein Teil der eingesetzten Virusantikörper in der Lage, das VP3 spezifisch zu markieren, wobei die einzelnen Antikörper unterschiedlich stark das heterogene Erscheinungsbild des VP3 mit zahlreichen, kaum zu unterscheidenden Banden zwischen 27 und 44kD erkannten. Reaktionen mit VP2 und VP1 konnten, wie auch von anderen Autoren beschrieben (Coutelier *et al.*, 1986; Harty *et al.*, 1987) nicht beobachtet werden. Ebenso wie in der Immunpräzipitation markierte der anti-LDV-Serumpool das 24kD-Protein nur im Lysat infizierter Makrophagen, ein weiteres Indiz dafür, daß es sich um eine Vorstufe des VP3 handeln könnte. Im Immunoblotting mit gereinigtem Virusmaterial war diese Bande nicht zu beobachten.

Monoklonale Golgi-Antikörper, die im Immunoblotting auf infizierten Makrophagen eingesetzt worden waren, konnten keine virusspezifischen Proteine markieren und damit keinen Hinweis auf eine mögliche Kreuzreaktion zwischen Golgi- und Virusantigenen geben.

Auf die Frage, wie eine Virusinfektion die Autoantikörper-Produktion induzieren kann, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten (Übersicht bei: Notkins *et al.*, 1984):

1) Virusprotein und Wirtszellprotein können gemeinsame antigene Determinanten tragen. Eine polyklonale Immunantwort auf die Virusinfektion kann zur Bildung kreuzreagierender Antikörper führen, die als Autoantikörper mit Wirtszellantigen reagieren.

2) Die Infektion von Zellen mit einem Virus kann zelleigene Strukturen verändern. Wirtszellproteine, die durch virales Protein

oder virale Nukleinsäure modifiziert sind, können vom Immunsystem als fremd erkannt werden, wenn sie an der Zelloberfläche präsentiert werden oder durch Zerstörung der Zellen frei werden. Kreuzreaktionen zwischen verfremdetem und unverändertem Antigen können die Autoimmunantwort dann auslösen.

3)Die Virusinfektion kann Einfluß auf regulatorische Funktionen des Immunsystems nehmen, z.B. wenn dafür maßgebliche Zellen infiziert, stimuliert oder zerstört werden.

4) Die Autoantikörper können anti-idiotypische Antikörper sein, die als Reaktion auf antivirale Antikörper gebildet werden. Solche Autoantikörper könnten, wie das Virus selbst, Oberflächenrezeptoren der für das Virus permissiven Zellen erkennen und sie schädigen.

Gegen Kreuzreaktionen zwischen Virus- und Autoantigen als Auslöser der LDV-induzierten Autoimmunität gegen Golgi-Antigene spricht, daß in keinem der in dieser Arbeit verwendeten immunologischen Nachweisverfahren monoklonale Virusantikörper beobachtet werden konnten, die mit Golgi-Antigen kreuzreagieren und keine monoklonalen Golgi-Antikörper, die mit virusinfizierten Zellen kreuzreagieren. Darüberhinaus wird die gegen Golgi-Antigen gerichtete Autoimmunantwort lange vor der Immunantwort gegen Virusantigene erkennbar. Hingegen kann die gegen Strukturen des Zytoskeletts gerichtete Autoimmunität eher auf Kreuzantigenität zwischen Erreger- und Autoantigen beruhen. Zum einen wird die Immunantwort gegen LDV nachweisbar bevor die Autoimmunreaktion gegen Zytoskelettantigene deutlich erkennbar ist, zum anderen gelang die Etablierung eines Hybridoms, das Antikörper gegen kreuzreagierende antigene Determinanten von LDV und Zytoskelett sezerniert.

Die Autoimmunisierung gegen Golgi-Antigen dürfte möglicherweise auf der Verfremdung dieser Antigene durch virale Produkte beruhen. Die Morphogenese von LDV erfolgt durch Knospung an Membranen zytoplasmatischer Vesikel in der Golgi-Region (s.Abb.1). Beim Zerfall der virusinfizierten Zellen könnten Selbst-Antigene frei werden, die eine Autoimmunantwort stimulieren. Nach allgemeiner Ansicht genügt in der Regel nicht die bloße Freisetzung intrazellulärer Antigene für die Induktion von Autoimmunität. Nach Mathew & Bernstein (1983) wird zelleigenes Antigen erst als fremd

erkannt, wenn es kombiniert ist mit fremder oder veränderter Nukleinsäure. Vorausgesetzt, es handelt sich bei den zytoplasmatischen Vesikeln in der Golgi-Region, in denen die LDV-Reifung stattfindet, um Golgi-Vesikel, so ist vorstellbar, daß eine Kombination von LDV-Nukleinsäure mit Bestandteilen des Golgi-Apparates die Autoimmunität auslösen könnte.

Um diese Vorstellungen zu prüfen, sollen monoklonale anti-Golgi-Antikörper an LDV_{AGIA}-infizierten Makrophagen in der Immunelektronenmikroskopie angewendet werden. Diese Untersuchungen könnten zur Identifizierung der zytoplasmatischen Vesikeln beitragen, in denen die Virusreifung erfolgt.

In die Überlegungen über die Entstehung der LDV-induzierten Autoimmunantwort muß einbezogen werden, daß Ia-positive Makrophagen, also die beim "processing" von Antigenen maßgeblichen Zellen, auch die für dieses Virus permissiven Zellen darstellen. Auf diese Tatsache ist möglicherweise zurückzuführen, daß die LDV-induzierte Autoimmunität gegen Golgi-Antigen so früh und so regelmäßig nach der Infektion erfolgt.

Monoklonale Golgi-Antikörper sollten nicht nur zur Identifizierung der zytoplasmatischen Vesikeln beitragen, in denen die Virusreifung erfolgt. Sie sollten darüberhinaus zur Isolierung von Autoantigenen eingesetzt werden, um die molekulare Grundlage von Autoimmunprozessen zu untersuchen. So könnte geprüft werden, ob durch isolierte Autoantigene eine Immunantwort ausgelöst werden kann oder ob sie gegebenenfalls "verfremdet" werden müssen, z.B. durch Kombination mit Bestandteilen des Virus.

6. Zusammenfassung

1) Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA} induziert regelmäßig die Bildung von Autoantikörpern. Autoantikörper gegen Golgi-Antigen und ein Oberflächenantigen bestimmter Tumorzellen, die die Grundlage für einen Bioassay zum Nachweis des Erregers bildeten, wurden in der ersten Woche nach der Infektion nachweisbar. Zusätzlich konnten Autoantikörper gegen weitere zelluläre Strukturen (Zytoskelett, Mitochondrien- und Kern-assoziiertes Antigen) in der indirekten Immunfluoreszenz beobachtet werden.

2) Bereits sieben Tage nach der Infektion dominierten die anti-Golgi-Antikörper in den Immunglobulinsubklassen IgG_{2a} und IgG_{2b}.

3) Mit Hilfe der Hybridomtechnik gelang die Produktion monoklonaler Autoantikörper gegen Golgi- und weitere zelluläre Antigene nach Infektion von STU-Mäusen mit LDV_{AGIA}.

Das Maximum an Golgi-Antikörper-produzierenden Hybridomen wurde in Fusionen beobachtet, die 9 bzw. 14 Tage nach der Infektion durchgeführt worden waren.

Von 19 Golgi-Antikörper-produzierenden Hybridomen sezernierten drei IgM-Antikörper, neun Antikörper der Subklasse IgG_{2a} und sieben der Subklasse IgG_{2b}. Antikörper gegen andere zelluläre Strukturen gehörten bis auf eine Ausnahme der IgM-Subklasse an.

4) Die Spezifität der durch die Autoantikörper markierten zellulären Antigene konnte durch Behandlung der Kulturzellen mit solchen Reagenzien, die die Morphologie subzellulärer Strukturen in charakteristischer Weise veränderten, bzw. durch Anwendung von Spezialfärbungen nachgewiesen werden.

5) Monoklonale Golgi-Antikörper zeigten unterschiedliche Reaktionsbreite bei Kulturzellen verschiedener Spezies. Einige zeigten breite Kreuzreaktivität und reagierten mit antigenen Determinanten in der Golgi-Region von Säuger-, Geflügel- und Fischzellen, einige reagierten nur mit Golgi-Antigen in Säugerzellen und ein Antikörper markierte den Golgi-Apparat nur in der

für das Screening nach der Fusion verwendeten murinen Targetzelle.

6) Mit Hilfe der monoklonalen Golgi-Antikörper war es möglich, 4 Antigene mit den Molekulargewichten >300, 145, 96 und 80kD in der Radioimmunpräzipitation spezifisch zu erkennen.

Der Einsatz der Antikörper im Immunoblottingverfahren erlaubte ebenfalls die spezifische Markierung von 4 Antigenen (Molekulargewichte: 95, 58, 43 und 36kD).

7) In der Immunelektronenmikroskopie konnten mit poly- und monoklonalen Golgi-Antikörpern unterschiedliche Anteile der Organelle markiert werden. Während polyklonale Antikörper weite Teile des Golgi-Apparates erkannten, reagierten monoklonale Antikörper oft nur mit distinkten Bereichen der Organelle.

8) In mehreren Fusionen konnten LDV-spezifische monoklonale Virusantikörper etabliert werden, die Virusantigen in der indirekten Immunfluoreszenz bei infizierten Makrophagen erkannten.

9) Ein Hybridom produzierte Antikörper, die mit Zytoskelett- und Virusantigen kreuzreagierten.

10) Der Einsatz poly- und monoklonaler Virusantikörper in der Radioimmunpräzipitation führte zur Erkennung aller 3 Virusproteine (VP1 bis 3) in Lysat und Kulturüberstand infizierter Makrophagen. Im Immunoblottingverfahren konnte in verschiedenen Viruspräparationen nur VP3 spezifisch markiert werden.

11) Bislang wurden keine Hinweise auf Kreuzantigenität zwischen Virus- und Golgi-Antigen erhalten.

7. Literaturverzeichnis

ALLAN, V.J. & KREIS, T.E. (1986). A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi-apparatus.
J. Cell Biol. 103, 2229-2239

BEAMS, H.W. & KESSEL, R.G. (1968). The Golgi apparatus: Structure and function.
Int. Rev. Cytol. 23, 209-276

BÖHME, M.W.J., EVANS, D.A., MILES, M.A. & HOLBOROW, E.J. (1986). Occurence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation.
Immunology 59, 583-588

BRINTON-DARNELL, M. & PLAGEMANN, P.G.W. (1975). Structure and chemical-physical characteristics of lactate dehydrogenase-elevating virus and its RNA.
J. Virol. 16, 420-433

BRINTON-DARNELL, M., COLLINS, J.K. & PLAGEMANN, P.G.W. (1975). Lactate dehydrogenase-elevating virus replication, maturation und viral RNA synthesis in primary mouse macrophage cultures.
Virology 65, 187-195

BURKE, B., GRIFFITHS, G., REGGIO, H., LOUVARD, D. & WARREN, G. (1982). A monoclonal antibody against a 135-K Golgi membrane protein.
EMBO J. 1 (12), 1621-1628

CARFRUNY, W.A. & PLAGEMANN, P.G.W. (1982a). Immune response to lactate dehydrogenase-elevating virus: Isolation of infectious virus-immunoglobulin G complexes and quantitation of specific antiviral immunoglobulin G response in wild-type and nude mice.
Infect. Immun. 37 (3), 1001-1006

CARFRUNY, W.A. & PLAGEMANN, P.G.W. (1982). Immune response to lactate dehydrogenase-elevating virus: Serologically specific rabbit neutralizing antibody to the virus.
Infec. Immun. **37** (3), 1007-1012

CHICHEPORTICHE, Y., VASALLI,P. & TARTAKOFF, A.M. (1984). Characterization of cytoplasmically oriented Golgi proteins with a monoclonal antibody.
J. Cell Biol. **99**, 2200-2210

COUBLE, P., BLAES, N. & PRUDHOMME, J.C. (1984). Actin microfilaments and fibroin secretion in the silkgland cells of Bombyx mori (effects of cytochalasin B).
Exp. Cell. Res. **151**, 322-331

COUTELIER, J.-P. & VAN SNICK, J. (1985). Isotypically restricted activation of B lymphocytes by lactic dehydrogenase virus.
Eur. J. Immunol. **15**, 250-255

COUTELIER,J.-P., VAN ROOST, E., LAMBOTTE, P. & VAN SNICK, J. (1986). The murine antibody response to lactate dehydrogenase-elevating virus.
J. gen. Virol. **67**, 1099-1108

CURRAN, T. & TEICH, N.M. (1982). Identification of a 39,000-Dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus.
Virology **116**, 221-235

DALES, S., FUJINAMI, R.S. & OLDSTONE, M.B.A. (1983). Infection with vaccinia favors the selection of hybridomas synthesizing autoantibodies against intermediate filaments, one of them crossreacting with the virus hemagglutinin.
J. Immunol. **131** (3), 1546-1553

DELLAGI, K., BROUET, J.-C., PERREAU, J. & POULIN, D. (1982). Human monoclonal IgM with autoantibody actvity against intermediate filaments.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 446-450

DELLAGI, K. & BROUET, J.-C. (1982). Redistribution of intermediate filaments during capping of lymphocyte surface molecules.
Nature **298**, 284-286

DUNPHY. W.G. & ROTHMAN, J.E. (1985). Compartimental organization of the Golgi stack.
Cell **42**, 13-21

DUNPHY, W.G., BRANDS, R. & ROTHMAN, J.E. (1985). Attachment of terminal N-acetylglucosamine to asparagine-linked oligosaccharides occurs in central cisternae of the Golgi-stack.
Cell **40**, 463-472

FEY, E.G., WAN, K.M. & PENMAN, S. (1984). Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: Three dimensional organization and protein composition.
J. Cell Biol. **98**, 1973-1984

FRANCOEUR, A.-M., PEEBLES, C.L., HECKMAN, K.J., LEE, J.C. & TAN, E.M. (1985). Identification of ribosomal autoantigens.
J. Immunol. **135** (4), 2378

FRANKE, W.W., SCHMID, E., OSBORN, M. & WEBER, K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 5034-5038

FRAZER, I.H., MACKAY, I.R., JORDAN, T.W., WHITTINGHAM, S. & MARZUKI, S. (1985). Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: Definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens.
J. Immunol. **135**, 1739-1745

FRITZLER, M.J., ETHERINGTON, J. SOKOLUK, C. KINSELLA, T.D. & VALENCIA, D.W. (1984). Antibodies from patients with autoimmune disease react with a cytoplasmic antigen in the Golgi apparatus.
J. Immunol. 132, 2904-2908

FUJINAMI, R.S., OLDSTONE, M.B.A., WROBLEWSKA, Z., FRANKEL, M.E. & KOPROWSKI, H. (1983). Molecular mimikry in virus infection: Crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2346-2350

GOLDFISCHER, S. (1982). The internal reticular apparatus of Camillo Golgi: A complex, heterogeneous organelle, enriched in acid, neutral, and alkaline phosphatase, and involved in glycosylation, secretion, membrane flow, lysosome formation and intracellular digestion.
J. Histochem. Cytochem. 30 (7), 717-733

GOULD, E.A., CHANAS, A.C., BUCKLEY, A. & CLEGG, C.S. (1983). Monoclonal immunoglobulin M antibody to japanese encephalitis virus that can react with a nuclear antigen in mammalian cells.
Inf. Immun. 41 (3), 774-779

HÄMMERLING, G.J. & HÄMMERLING, U. (1981). Production of antibody-producing hybridomas in the rodent system.
Research Monographs in Immunology Vol. 3: Monoclonal antibodies and T-cell hybridomas

HAHN, E.C. & KENYON, A.J. (1980). Anti-deoxyribonucleic acid antibody associated with persistent infection of mink with aleutian disease virus.
Inf. Immun. 29 (2), 452-458

HARTY, J.T., CHAN, S.P.K. & PLAGEMANN, P.G.W. (1987). Characteristics of monoclonal antibodies to the lactate dehydrogenase-elevating virus.
Intervirology 27, 53-60

HASPEL, M.V., ONODERA, T., PRABHAKAR, B.S., HORITA, M., SUZUKI, H. & NOTKINS, A.L. (1983a). Virus-induced autoimmunity: Monoclonal antibodies that react with endocrine tissues.
Science 220, 304-306

HASPEL, M. V., ONODERA, T., PRABHAKAR, B.S., McCLINTOCK, P.R., ESSANI, K., RAY, U.R., YAGIHASHI, S. & NOTKINS, A.L. (1983b). Multiple organ-reactive monoclonal autoantibodies.
Nature 304, 73-76

HILLER, G. & WEBER, K. (1982). Golgi detection in mitotic and interphase cells by antibodies to secreted galactosyl-transferase.
Exp. Cell Res. 142, 84-94

HORMIA, M., LINDER, E. , LEHTO, V.-P., VARTIO, T., BADLEY, R.A. & VIRTANEN, I. (1982). Vimentin filaments in cultured endothelial cells from butyrate-sensitive juxtanuclear masses after repeated subculture.
Exp. Cell Res. 138, 159-166

HORZINEK, M.C., VAN WIELINK, P.S. & ELLENS, D. J. (1975). Purification and electron microscopy of lactic dehydrogenase virus of mice.
J. gen. Virol. 26, 217-226

INADA, T. & MIMS, C.A. (1984). Mouse Ia-antigens are receptors for lactate dehydrogenase virus.
Nature 309, 59-61

INADA, T. & MIMS, C.A. (1985). Ia antigens and Fc receptors of mouse peritoneal macrophages as determinants of susceptibility to lactic dehydrogenase virus.
J. gen. Virol. 66, 1469-1477

JOHNSON, G.D., DAVIDSON, R.S., McNAMEE, K.C., RUSSEL, G., GOODWIN, D. & HOLBOROW, E.J. (1982). Fading of immunofluorescence during microscopy: A study of the phenomenon and its remedy.
J. Immunol. Meth., 55, 231-242

JOHNSON, L.V., WALSH, M.L., BOCKUS, B.J. & CHEN, L.B. (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy.
J. Cell Biol. 88, 526-535

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

LAGWINSKA, E., STEWART, C.C., ADLES, C. & SCHLESINGER, S. (1975). Replication of lactic dehydrogenase virus and sindbis virus in mouse peritoneal macrophages. Induction of interferon and phenotypic mixing.
Virology 65, 204-214

LIN, J.J.-C. & QUEALLY, S.A. (1982). A monoclonal antibody that recognized Golgi-associated protein of cultured fibroblast cells.
J. Cell Biol. 92, 108-112

LOUVARD, D., REGGIO, H. & WARREN, G. (1982). Antibodies to the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum.
J. Cell Biol. 92, 92-107

MARTINEZ, D. BRINTON, M.A., TACHOVSKY, T.G. & PHELBS, A. H. (1980). Identification of lactate dehydrogenase-elevating virus as the etiological agent of genetically restricted, age- dependent polioencephalomyelitis of mice.
Infect. Immun. **27**, 979-987

MATHEWS, M.B. & BERNSTEIN, R.M. (1983). Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA-synthetase: A model for autoimmunity.
Nature **304**, 177-179

McDONALD, T.L., DONELLY, T., WEBER, A. & QUENETTE, L. (1983). Antibody classes and subclasses in circulating immune complexes isolated from mice infected with lactic dehydrogenase virus.
Immunology **48**, 511-517

MICHAELIDIS, M.C. & SIMMS, E.S. (1977). Immune response in mice infected with lactic dehydrogenase virus. I. Antibody response to DNP-BGG and hyperglobulinaemia in Balb/c-mice.
Immunology **32**, 981-988

NAWROCKI, J.F., PEASE, L.R. & MURPHY, W.H. (1980). Etiologic role of lactic dehydrogenase virus infection in an age-dependent neuroparalytic disease in C58-mice.
Virology **103**, 259-264

NEU, N., BEISEL, K.W., TRAYSTMAN, M.D., ROSE, N.R. & CRAIG, S.W. (1987). Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to coxsackievirus B_3-induced myocarditis.
J. Immunol. **138**, 2488-2492

NIGG, E.A., SCHÄFER, G., HILZ, H. & EPPENBERGER, H.M. (1985). Cyclic-AMP-dependent protein kinase type III is associated with the Golgi complex and with centrosomes.
Cell **41**, 1039-1051

NOTKINS, A.L., MAHAR, S., SCHEELE, C. & GOFFMAN, J. (1966). Infectious virus-antibody complex in the blood of chronically infected mice.
J. Exp. Med. 124, 81-97

NOTKINS, A.L., ONODERA, T. & PRABHAKAR, B. (1984). Virus-induced autoimmunity.
in: Concepts on viral pathogenesis. Eds: Notkins, A.L. & Oldstone, M.B.A.. Springer Verlag

NOWINSKI, R.C., LOSTROM, M.E., TAM, M.R., STONE, M.R. & BURNETTE, W.N. (1979). The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses.
Virology 93, 111-126

ONODERA, T., TONIOLO, A., RAY, U.R., JENSON, A.B., KNAZEK, R.A. & NOTKINS, A.L. (1981). Virus-induced diabetes mellitus. XX. Polyendocrinopathy and autoimmunity.
J. Exp. Med. 153, 1457-1473

ONODERA, T., RAY, U.R., MELEZ, K.A., SUZUKI, H., TONIOLO, A. & NOTKINS, A.L. (1982). Virus-induced diabetes mellitus: Autoimmunuty and polyendocrine disease prevented by immunosuppression.
Nature 297, 66-68

ORCI, L., RAVAZZOLA, M., AMHERDT, M., LOUVARD, D. & PERRELET, A. (1985). Clathrin-immunoreactive sites in the Golgi-apparatus are concentrated in the trans pole in poypeptide hormone-secreting cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5385-5389

OTTER, T., KING, S.M. & WITMAN, G.B. (1987). A two step procedure for efficient electrotransfer of both high-molecular-weight (>400,000) and low-molecular-weight (<20,000) proteins.
Anal. Biochem. 162, 370-377

OUCHTERLONY, Ö. & NILSSON, L.-A. (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
Handbook of experimental immunology. Ed: Weir, D.M., Third edition Vol. 1

OXFORD, J. (1982). The use of monoclonal antibodies in virology.
J. Hyg. **88**, 361-368

QUADE, K. (1979). Transformation of mammalian cells by avian myelocytomatosis virus and avian erythblastosis virus.
Virology **98**, 461-465

RILEY, V., LILLY, F., HUERTO, E. & BARDELL, D. (1960). Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasms
Science **132**, 545-547

RODRIGUEZ, J.L., GELPI, C., THOMSON, T.M., REAL, F.J & FERNANDEZ, J. (1982). Anti-Golgi complex autoantibodies in a patient with Sjögren's syndrome and lymphoma.
Clin. Exp. Immunol. **49**, 579-586

ROTH, J. & BERGER, E.G. (1982). Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: Codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae.
J. Cell Biol. **93**, 223-229

ROTH, J., TAATJES, D.J., LUCOCQ, J.M., WEINSTEIN, J. & PAULSON, J.C. (1985). Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation.
Cell **43**, 287-295

ROWSON, K.E.K. & MAHY, B.W.J. (1975). Lactic dehydrogenase virus.
Virology monographs, vol. 13, pp. 1-121. Vienna & New York, Springer Verlag

ROWSON, K.E.K. & MAHY, B.W.J. (1985). Lactate dehydrogenase-elevating virus.
J. gen. Virol. **66**, 2297-2312

RUBIN, R.L., TANG, F.-L., CHAN, E.K.L., POLLARD, K.M., TSAY, G. & TAN, E.M. (1986). IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome and drug-induced autoimmunity.
J. Immunol. **137**, 2528-2534

SCHÄFER, W. (1979). Der Mäuse-Inzuchtstamm STU. Entwicklung und Eigenschaften.
Z. Naturforsch. **34c**, 306-309

SCHWARTZ, R.S. (1986). Anti-DNA antibodies and the problem of autoimmunity.
Cell. Immunol. **99**, 38-43

SELIGMAN, A.M., WASSERKRUG, H.L. & HANKER, J.S. (1966). A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH).
J. Cell Biol. **30**, 424-432

SHULMAN, M., WILDE, C.D. & KÖHLER, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies.
Nature **276**, 269-270

SMITH, Z.D.J., D'EUGENIO-GUMKOWSKY, F., YANAGISAWA, K. & JAMIESON, J.D. (1984). Endogenous and monoclonal antibodies to the rat pancreatic acinar cell Golgi complex.
J. Cell Biol. **98**, 2035-2046

STOTT, D. (1985). Autoantibodies and nuclear antigens.
Immunol. today **6**(11), 314-315

STRAUS, W. (1982). Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH.
J. Histochem. Cytochem. 30(5), 491-493

STUECKEMANN, J.A., HOLTH, M., SWART, W.J., KOWALCHYK, K., SMITH, M.S., WOLSTENHOLME, A.J., CAFRUNY, W.A. & PLAGEMANN, P.G.W. (1982a). Replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in macrophages. 2. Mechanism of persistent infection in mice and cell culture.
J. gen. Virol. 59, 263-272

STUECKEMANN, J.A., RITZI, D.M., HOLTH, M., SMITH, M.S., SWART, W.J., CAFRUNY, W.A. & PLAGEMANN, G.W. (1982b). Replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in macrophages. 1. Evidence for cytocidal replication.
J. gen. Virol. 59, 245-262

TARDIEU, M., POWERS, M.L., HAFLER, D.A., HAUSER, S.L. & WEINER, H.L. (1984). Autoimmunity following viral infection: Demonstration of monoclonal antibodies against normal tissue following infection of mice with reovirus and demonstration of shared antigenicity between virus and lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 14, 561-565

TONG, S.L., STUECKEMANN, J.A. & PLAGEMANN, P.G.W. (1977). Autoradiographic method for detection of lactate dehydrogenase-elevating virus-infected cells in primary mouse macrophage cultures.
J. Virol. 22, 219-227

WEILAND, E., WEILAND, F. & THIEL, H.-J. (1984). Autoantibody activity against evolutionary conserved juxtanuclearly arranged antigen in mice with tumors induced by a progressor Moloney sarcoma virus transformant.
Exp. Cell Biol. 52, 300-310

WEILAND, E. & WEILAND, F. (1985). Detection and preliminary characterization of a transmissible agent inducing autoimmunity against Golgi-antigen.
Clin. Exp. Immunol. **62**, 167-175

WEILAND, E. & THIEL, H.-J. (1985). Monoclonal antibody detects a common surface antigen on two independently established murine Moloney sarcoma virus non-producer transformants.
J. gen. Virol. **66**, 1863-1872

WEILAND, E., WEILAND, F. & GROßMANN, A. (1987). Lactate dehydrogenase-elevating virus induces anti-Golgi apparatus antibodies.
J. gen. Virol. **68**, 1983-1991

WOLFGRAM, L.J., BEISEL, K.W. & ROSE, N.R. (1985). Heart-specific autoantibodies following murine coxsackievirus B_3 myocarditis.
J. Exp. Med. **161**, 1112-1121

YUAN, L., BARRICANAL, J.G., BONIFACINO, J.S. & SANDOVAL, I.V. (1987). Two integral membrane proteins located in the cis-middle and trans-part of the Golgi system aquire sialylated N-linked carbohydrates and display different turnovers and sensitivity to cAMP-dependent phosphorylation.
J. Cell Biol. **105**, 215-227

8. Abkürzungen

AGIA:	anti-Golgi inducing agent
DABCO:	1,4,-Diazobicyclo(2.2.2.)octan
d:	Tag
dest:	destilliert
DMEM:	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
FCS:	Foetales Kälberserum
FITC:	Fluoreszeinisothiozyanat
h:	Stunde
HAT:	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HT:	Hypoxanthin, Thymidin
ID:	infektiöse Dosis
Ig:	Immunglobulin
i.m.:	intramuskulär
i.p.:	intaperitoneal
LDH:	Laktatdehydrogenase
LDV:	Laktatdehydrogenase-Virus
MEM:	Minimal Essential Medium
min:	Minute
p.A.:	zur Analyse
PBS:	Phosphat-gepufferte Saline
PEG:	Polyethylenglykol
p.i.:	nach Infektion
PO:	Peroxidase
PPO:	2,5-Diphenyloxazol
RIP:	Radioimmunpräzipitation
RNA:	Ribonukleinsäure
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
SDS:	Natriumdodezylsulfat
TSA:	Tumoroberflächenantigen
UpM:	Umdrehungen pro Minute
VP:	Virusprotein

Lebenslauf

Name, Vorname:	Großmann, Armin
Geboren:	6. Juni 1955 in Leonberg
Eltern:	Willi Großmann und Inge Großmann, geb. Skatikat

Schulausbildung:

1962 - 1966	Grundschule in Leonberg
1966 - 1974	Albert-Schweitzer-Gymnasium in Leonberg
Mai 1974	Reifeprüfung

Studium:

1974 - 1976	Pädagogische Hochschule in Reutlingen Studienfächer: Pädagogik, Biologie, Deutsch und Philosophie
1977 - 1983	Universität Tübingen Studienfach: Biologie
1978 - 1983	Universität Tübingen Studienfach: Empirische Kulturwissenschaften
März 1983	Diplomprüfung in Biologie
1983 - 1984	Diplomarbeit am Institut für Biologie II unter Leitung von Prof. Dr. E. Sander
August 1984	Biologie-Diplom
1984 - 1987	Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. E. Sander und Dr. E. Weiland

Meine akademischen Lehrer waren: Ammermann, Bentrup, Braun, Lange, Mecke, Sander, Seyffert, Seitz, Wenk

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45